

Stereologische Analyse von Mikroglia und afferenten
Terminalen im Facialiskerngebiet nach facio-facialer
Anastomose bei der Ratte und Korrelation polyinnervierter
Endplatten mit der Vibrissenbewegung

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Philipp Ernst
geboren am 31.12.1983 in Dresden
Jena 2013

Gutachter

- 1. Prof. Dr. med. Orlando Guntinas-Lichius, Universitätsklinik für HNO Jena**
- 2. Prof. Dr. med. Hubertus Axer, Universitätsklinik für Neurologie Jena**
- 3. Prof. Dr. med. Doychin Angolov, Institut I für Anatomie Universitätsklinik Köln**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.05.2014

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

A	Fläche
a	Winkelbeschleunigung
Abb.	Abbildung
AchE	Acetylcholinesterase
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
ChAT	Cholin-Acetyltransferase
cos	Cosinus
Cy3	Indocarbocyanin, rot fluoreszierender Farbstoff
dt	differentielle Änderung der Zeit
d ϕ	differentielle Änderung des Winkels
d ω	differentielle Änderung der Winkelgeschwindigkeit
Exz.	exzitatorische Terminale
et al.	et alia
FFA	facio-faciale Anastomose
g	Gramm
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
Iba1	ionisierendes-Calcium-bindendes-Adaptermolekül-1
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
Inh.	inhibitorische Terminale
kg	Kilogramm
KG	Kontrollgruppe
LLS	Musculus levator labii superioris
M./ Mm.	Musculus/ Musculi (Plural)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
ms	Millisekunde
N.	Nervus
N	Anzahl
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
n.	nervi (Genitiv)
nAChR	nikotinerger Acetylcholin-Rezeptor
Ncl./ Ncll.	Nucleus/ Nuclei (Plural)
nm	Nanometer
Nv	numerische Dichte
o. g.	oben genannt

p	Signifikanzniveau
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
pH	negativ, dekadische Logarithmus der Protonenkonzentration
r	Regressionskoeffizient
rad	Radiant
s.	siehe
s	Sekunde
SEM	standard error oft the mean
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
V	Volumen
VGAT	vesikulärer GABA-Transporter
VGLUT2	vesikulärer Glutamat-Transporter-2
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
α	Alpha
β	Beta
λ	Lambda
φ	Phi, Winkel bei Protraktion (ϕ_P) und Winkel bei Retraktion (ϕ_R)
ω	Omega, Winkelgeschwindigkeit
\vec{x}	Richtungsvektor
%	Prozent
°C	Grad Celsius
°	Grad

Inhalt

Zusammenfassung	7
1. Einleitung	9
1.1 Die traumatische Läsion des N. facialis und dessen Management	9
1.2 Degeneration und Regeneration peripherer Nerven.....	10
1.3 Anatomie des N. facialis	11
1.4 Pathologie und Klinik der peripheren Facialisläsion	12
1.5 Pathophysiologie der Defektheilung des N. facialis.....	13
2. Ziele der Arbeit	15
3. Material und Methodik.....	16
3.1 Versuchstiere	16
3.2 Operationstechnik	16
3.3 Analyse des Ncl. n. facialis.....	18
3.3.1 Gewebepräparation.....	18
3.3.2 Antikörper.....	20
3.3.3 Immunhistochemische Färbung	20
3.3.4 Stereologie	21
3.3.4.1 Volumen	24
3.3.4.2 Motoneurone	24
3.3.4.3 Iba1	25
3.3.4.4 VGLUT2	26
3.3.4.5 VGAT	27
3.3.4.6 ChAT	27
3.3.4.7 Photodokumentation	28
3.4 Analyse der Vibrissenbewegungen	29
3.4.1 Amplitude, Winkelgeschwindigkeit und Winkelbeschleunigung	29
3.5 Analyse muskulärer Reinnervation.....	32
3.5.1 Gewebepräparation.....	32
3.5.2 Immunhistochemie	33
3.5.3 Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung.....	33
3.6 Statistische Auswertung	35

4. Ergebnisse	36
4.1 Eine funktionelle Regeneration der Vibrissenmotorik ist limitiert	36
4.2 Abnahme exzitatorischer und Zunahme inhibitorischer Terminale	37
4.3 Verlust motoneuronaler perisomatischer cholinergischer Synapsen	40
4.4 Der Facialiskern atrophiert während der Nervenzellregeneration.....	42
4.5 Reaktive Zunahme der Mikroglia im Facialiskern nach peripherer Axotomie des N. facialis	43
4.6 Vermehrte Polyinnervation neuromuskulärer Endplatten	45
4.7 Korrelationsanalysen zwischen funktionellen und strukturellen Parametern ...	46
5. Diskussion	49
5.1 Progredienz inhibitorischer Terminale und Abnahme des exzitatorischen Inputs im regenerierenden Facialiskerngebiet.....	49
5.2 Abnahme modulierender cholinergischer Synapsen an Motoneuronen und funktionelle Folgen	51
5.3 Atrophie des Facialiskerns und nukleäre Deafferenzierung	52
5.4 Persistierende Mikrogliose während der Facialiskernregeneration	53
5.5 Polyneuronalen Innervation neuromuskulärer Endplatten als limitierender Faktor für die funktionelle Wiederherstellung	55
6. Schlussfolgerungen	57
7. Literatur- und Quellenverzeichnis	58
8. Anhang	66
8.1 Tabellen.....	66
8.2 Lebenslauf.....	67
8.3 Danksagung	68
8.4 Ehrenwörtliche Erklärung	69
8.5 Publikation.....	70

Zusammenfassung

Mit der Durchtrennung des Facialisnervs wird eine Vielzahl von Prozessen in Gang gesetzt, die der Nervenregeneration und Reinnervation der Muskulatur dienen. Die eigentliche Funktion der Motoneurone, die Generierung von Aktionspotentialen zur Ausbildung von Muskelkontraktionen, wird herunter reguliert. Solche reaktiven Prozesse sind zum einen die Deafferenzierung des Facialiskerngebiets, um ein schädigendes Übermaß exzitatorischen Inputs an den Motoneuronen zu vermeiden und zum anderen eine damit assoziierte Mikrogliose, welche, neben der initialen Aufrechterhaltung der Vitalität von Motoneuronen, die Fähigkeit besitzt über eine Neosynaptogenese die Reafferenzierung des Facialiskerngebiets zu modulieren. Bisher wurden diese Prozesse bis 2 Monate nach Durchtrennung des Facialisnervs und facio-facialer Anastomose (FFA) nachbeobachtet, wobei sich zusätzlich noch eine Atrophie des Facialiskerngebiets und eine vermehrte Abnahme exzitatorischer Terminale, im Vergleich zu den inhibitorischen Terminalen, zeigte. Um diese Reaktionen im Facialiskerngebiet im weiteren Verlauf zu untersuchen, wurden 16 Ratten in zwei Gruppen (jeweils N = 8) eingeteilt, von denen die eine Gruppe eine facio-faciale Anastomose (FFA) nach Transsektion des Facialisnervs erhielt und die andere Gruppe ohne Facialisläsion nur scheinoperiert wurde. Vier Monate nach dem operativen Eingriff wurde der Hirnstamm entnommen und immunhistochemisch gefärbte Schnitte hergestellt, sodass der Facialiskern anschließend stereologisch ausgewertet werden konnte. Mittels fluoreszierender Antikörper gegen den vesikulären Glutamat-Transporter-2 (VGLUT2) und den vesikulären GABA-Transporter (VGAT) wurden sowohl die exzitatorischen als auch die inhibitorischen afferenten Terminalen im Facialiskern analysiert. Große C-Typ-Terminale, die cholinerge Präsynapsen an Nissl-gefärbten Motoneuronen-Perikarya und proximalen Dendriten darstellen, wurden mittels Antikörper gegen Cholinacetyltransferase (ChAT) gefärbt und analysiert. Mikroglia wurde mittels Antikörper gegen ionisiertes-Calcium-bindendes-Adaptermolekül-1 (Iba1) dargestellt. Die Ergebnisse der Untersuchungen 4 Monate nach FFA zeigten, dass das Facialiskerngebiet in seinem Volumen um -19% atrophiert, aber keine Atrophie oder ein Verlust von Motoneuronen zu Verzeichnen war. Vielmehr waren die exzitatorischen (VGLUT2⁺) und inhibitorischen (VGAT⁺) afferenten Terminalen in ihrer Gesamtheit um -8% reduziert. Dies war auf einen starken Verlust VGLUT2⁺ Terminale zurückzuführen, da

die Anzahl der VGAT⁺ Terminalen im Vergleich zu Kontrolltieren zugenommen hatte. Ebenfalls war eine signifikante Reduktion der ChAT⁺ axosomatischen Synapsendichte um -42% zu verzeichnen. Daraus resultiert eine verminderte Aktionspotentialbereitschaft und somit die reduzierte Modulation der frequentierten Rhythmik feuernder Motoneurone. Die Analyse der Mikroglia ergab, dass selbst 4 Monate nach FFA im Facialiskerngebiet noch eine Überzahl an Mikroglia im Vergleich zu Kontrolltieren vorlag. Dies kann als Ausdruck eines anhaltenden Prozesses der Reintegration afferenter Signale mit motoneuronalen Postsynapsen im Rahmen der Neosynaptogenese angesehen werden.

Während der Aussprossung der sich regenerierenden Axone des Facialisnervs können sich durch Fehlleitungen verschiedene pathologische Veränderungen in den Muskelfasern ergeben, die einen starken negativen Einfluss auf die Muskelfunktion ausüben. Mehrere neuromuskuläre Endplatten können zum einen polyneuronal, also durch Axonterminale verschiedener Motoneurone, oder zum anderen seriell durch eine einzige ausgeprossene Axonterminale gleichzeitig innerviert werden. Um zu überprüfen, ob der Grad der polyinnervierten Muskelfasern mit der Schwere der funktionellen Beeinträchtigung zusammen hängt, wurde die Vibrissenbewegung der Ratten 4 Monate nach FFA gefilmt und anschließend der ipsilaterale M. levator labii superioris, als repräsentativer externer Vibrissenmuskel, entnommen. In seriellen Schnitten wurden die Axonterminalen zwischen den Muskelfasern mit fluoreszierenden Antikörpern gegen ChAT und die neuromuskulären Endplatten mit Fluorophor-konjugiertem α -Bungarotoxin angefärbt. Als Parameter der Vibrissenkinematik, die den Grad der funktionellen Reintegration der Muskulatur widerspiegelt, wurde die maximale Amplitude der Vibrissenbewegungen verwendet. Vier Monate nach FFA wiesen 32% der neuromuskulären Endplatten eine Polyinnervation auf. Im Hinblick auf einen hypothetischen Zusammenhang zwischen dem Innervationszustand der Muskelfasern beider Gruppen und den funktionellen Parametern aus den Videoanalysen ergab sich eine starke negative Korrelation und somit eine Bestätigung des negativen Einflusses der Fehlinnervation auf das funktionelle Outcome nach Facialisregeneration.

1. Einleitung

1.1 Die traumatische Läsion des N. facialis und dessen Management

Aufgrund seiner anatomischen Lage ist der N. facialis beim Menschen der am meisten beeinträchtigte Nerv bei Verletzungen oder operativen Eingriffen im Kopf-Hals-Bereich (Odebode und Ologe 2006, Iseli et al. 2010). Die Konsequenzen sind auf funktioneller und psychologischer Ebene dramatisch. Im Vordergrund stehen hier der fehlende Schutz der Cornea durch den aufgehobenen reflektorischen Lidschluss und die eingeschränkte Nahrungsaufnahme, wobei Trinkprobleme die größte Einschränkung darstellen (Ross et al. 1991). Ist eine Situation eingetreten, bei der es zu einer Durchtrennung des N. facialis gekommen ist, so sind die Aussichten auf eine komplette Remission und funktionelle Erholung nach dem aktuellen Stand der chirurgischen Versorgung sehr eingeschränkt (Vaughan und Richardson 1993, Tomov et al. 2002, Starritt et al. 2011). Bei den traumatischen peripheren Nervenschädigungen hat es sich bewährt klare Kriterien für die Auswahl des therapeutischen Regimes festzulegen (Seddon 1942). Demnach wird eine Blockade der Nervenleitung ohne das Vorliegen einer axonalen Durchtrennung als Neuropraxie bezeichnet, welche typischerweise durch eine Resitutio ad integrum gekennzeichnet ist (Soreide 1981). Ist die Kontinuität der Axone jedoch unterbrochen, so wird bei Erhalt der Nervenhiillen von Axonotmesis gesprochen (Seddon 1942). Die Nervenfasern distal der peripheren Läsion gehen nach dem Prinzip der Waller-Degeneration (s. 1.2) zugrunde, wohingegen die proximalen Abschnitte im optimalen Fall wieder entlang der erhaltenen peripheren Hüllstrukturen auswachsen können und nach endgültiger Wiederherstellung ihre originäre Qualität erhalten (Burt et al. 1950, Koerber und Horch 1985). Die Durchtrennung des gesamten Nerven, also der Axone und Nervenhiillen, wird als Neurotmesis bezeichnet (Seddon 1942). In dem Fall ist bei Möglichkeit eine operative Koaptation mittels direkter Naht der Nervenstümpfe zu empfehlen (Guntinas-Lichius et al. 2006). Der maximale Zeitrahmen für eine axo-axonale Anastomose, welche noch ein befriedigendes funktionelles Benefit bewirkt, wird mit 30 Tagen angegeben (Bianchi et al. 2012). Ist eine direkte Nervennaht nicht möglich, stellt die autologe Nerven transplantation die nächste Interventionsmöglichkeit dar, indem zumeist der N. auricularis magnus oder der N. suralis als Interponat genutzt wird (Spector et al.

1991, Osinga et al. 2011). Die extratemporale Läsion des Facialisnervs kann derart lokalisiert sein, dass kein proximaler Nervenstumpf auffindbar ist. In solch einem Fall kann eine hypoglosso-faciale Jump-Anastomose erwogen werden, die, anders als die klassische hypoglosso-faciale Anastomose, keine ipsilaterale Hemilingualatrophie mehr nach sich zieht (Volk et al. 2011).

1.2 Degeneration und Regeneration peripherer Nerven

Die Regenerationsfähigkeit eines Neurons hängt von unterschiedlichen Faktoren ab. Neben der Schwere der Schädigung (Neuropraxie, Axonotmesis, Neurotmesis, s. 1.1) spielt hinsichtlich der Regenerationsmöglichkeit vor allem das Neuron umgebende Zellmilieu eine wesentliche Rolle (Richardson et al. 1980). Kommt es bei einer Nervenläsion zum Kontinuitätsverlust der Axone, so kann man in einem phasenhaften Verlauf die von Augustus Waller beschriebene Gesetzmäßigkeit der anterograde Degeneration des distalen Axonabschnittes beobachten (Waller 1852). Dies wird durch einen intrinsischen Mechanismus vermittelt, der über das Ubiquitin-Proteasom-System zu einer Art Selbstzerstörung des distalen Axonabschnittes führt (Lunn et al. 1989, Coleman et al. 1998). Später wurde dieses Phänomen von Liliana Lubinska am N. phrenicus einer Ratte erneut evaluiert und sie erkannte, dass die Waller'schen Degenerationen unterschiedlich dicker Nerven mit einer eigenen Dynamik assoziiert waren (Lubinska 1977). Demnach beginnt die Fragmentierung der Axone mit einer Latenz von 25 bis 45 Stunden primär an dem Ort der Läsion, um anschließend je nach Axondicke mit einer Geschwindigkeit von 46 bis 250 mm pro Tag zentrifugal fortzuschreiten (Lubinska 1977). Die Markscheidendegeneration erfolgt über eine erhöhte Proliferation der Schwann'schen Zellen, die zusammen mit eingewanderten Histiozyten die Markscheiden per Phagozytose abbauen und nach vollständiger Axonolyse die Ausbildung der Hanke-Büngner'schen Bänder initiieren (Blumcke und Niedorf 1966). Diese stellen von Schwann'schen Zellen eingenommene endoneurale Strukturen der degenerierten Nervenfasern dar und sollen den später neu aussprossenden Axonfasern eine Leitstruktur zur ursprünglichen Muskelfaser bieten (Thomas 1966, Son et al. 1996). Am proximalen Stumpf führt die retrograde Degeneration bis zum nächsten Ranvier-Schnürring, sie kann aber bei sehr proximalen Läsionen auch bis zum Perikaryon führen (Meier und

Sollmann 1977). Die umhüllenden Schwann'schen Zellen proliferieren in dem Bereich ebenfalls, jedoch mit einer Neigung zum Auswachsen nach distal (Blumcke und Niedorf 1966). Das Auswachsen von meist mehreren kollateralen Axonsprossen erfolgt in der Regel auf Höhe des Wachstumskolbens, der sich aus dem distalen Ranvier-Schnürring des proximalen Axonstumpfes gebildet hat (Friede und Bischhausen 1980). Erfolgt das Auswachsen der Axonsprossen entlang der Hanke-Büngner'schen Bänder, ist die Hauptvoraussetzung für eine erfolgreiche Reinnervation gegeben (Perry und Brown 1992).

1.3 Anatomie des N. facialis

Der N. facialis ist der siebte Hirnnerv und besteht, einschließlich des Anteils des N. intermedius, aus vier funktionellen Anteilen, die beim Menschen auf etwa 10000 bis 14000 Nervenfasern verteilt sind (Thurner et al. 1993). Über die Hälfte davon sind motorische Fasern, die dem Ncl. n. facialis entstammen und zur Versorgung der mimischen Muskulatur einschließlich der Mm. stylohyoideus, stapedius und des hinteren Bauches des M. digastricus dienen. Die parasymphatischen Anteile stammen aus dem Ncl. salivatorius superior und innervieren die Tränendrüse, Submandibular- und Sublingualdrüse, Mund- und Nasenschleimhaut sowie akzessorische Zungendrüsen (Trepel 2012). Des Weiteren enthält er einen speziell-viszerosensiblen Anteil aus den Ncll. tractus solitarii, der für die Schmeckempfindung der vorderen zwei Drittel der Zunge verantwortlich ist (Walker 1990). Zusätzlich verlaufen im Facialisnerv noch sensorische Fasern, die protopathische Informationen vom äußeren Gehörgang und Trommelfell zum Ncl. spinalis n. trigemini übermitteln (Iwata et al. 1972). Das motorische Kerngebiet für die orofaciale Muskulatur, der Ncl. n. facialis, befindet sich in der ventrolateralen Pons und besteht bei der Ratte aus fünf und sowohl bei der Maus als auch beim Menschen aus sechs Subnuclei innerhalb derer die mimische Muskulatur myotopisch repräsentiert ist (Martin und Lodge 1977, Komiyama et al. 1984, Nara et al. 1989). Eine Besonderheit, die bei der Ratte und beim Primaten histologisch nachgewiesen und beim Menschen durch magnetresonanztomographische Untersuchungen nachvollzogen werden konnte, stellen die dorsalen Anteile der dorsolateralen, dorsal intermediären und dorsomedialen Subnuclei dar, da diese nicht nur von kontralateralen sondern

bilateralen kortikonukleären Fasern erreicht werden (Jenny und Saper 1987, Urban et al. 2001, Choi und Raisman 2002). Aus diesem Grund bleibt den Patienten mit einseitiger supranukleärer Läsion die Fähigkeit zum beidseitigen Augenschluss erhalten. Umgeben wird das Kerngebiet von einer fibrösen und dendritischen Kapsel, der sogenannten perifacialen Zone (Olszewski und Baxter 1953). Dorsomedial der Kernregion, außerhalb der perifacialen Zone, befindet sich noch ein akzessorisches Facialiskerngebiet, auch suprafacialer Nucleus genannt, dessen Motoneurone den hinteren Bauch des M. digastricus und den M. stylohyoideus innervieren (Komiyama et al. 1984, Sherwood 2005). Die efferenten Fasern der Facialis-Motoneurone verlaufen sowohl beim Mensch als auch bei der Ratte zunächst nach dorsomedial und dorsokranial um den Ncl. n. abducens herum, bilden dabei das innere Facialisknie und verlassen anschließend den Hirnstamm am Unterrand der Pons im Kleinhirnbrückenwinkel (Watson et al. 1982, Cabrera et al. 1988).

1.4 Pathologie und Klinik der peripheren Facialisläsion

Die im klinischen Alltag häufig auftretende Form der peripheren Facialislähmung tritt idiopathisch auf und ist meist innerhalb von Tagen voll ausgeprägt (Turk-Boru et al. 2005). Eine entzündlich bedingte Schädigung des Nerven ist zum Großteil viral bedingt und eine Komplikation bei lymphozytären Meningitis oder eines Zoster oticus (Njoo et al. 1988, Ogita et al. 2006, Waespe et al. 2010). Im Rahmen einer bakteriellen Mastoiditis oder Otitis media kann es durch Infiltrationen sekundär ebenfalls zu einer Gesichtslähmung kommen (Redaelli de Zinis et al. 2003). Neoplastische Proliferationen sind prinzipiell im gesamten Verlauf des N. facialis in der Lage diesen zu irritieren, so durch Kompression über ein intrameatales Vestibularisschwannom oder durch Infiltration maligner Parotistumoren (Katoh et al. 1984, Wexler et al. 1990, Marzo et al. 2002). Kommt es bei einer Sturzverletzung mit Schädelfraktur zu einer Beteiligung des Felsenbeins, dann kann es bei Querfrakturen zu einer traumatischen Facialisparese kommen (Adegbite et al. 1991). Das klinische Bild präsentiert sich in Abhängigkeit zur Stelle der Läsion im Verlauf des Nerven. Ist der Defekt distal gelegen und betrifft nur einzelne motorische periphere Fasern, so kann durch ein asymmetrisches Lächeln sogar das Bild einer zentralen facialis Parese vorgetäuscht werden (Tulley et al. 2000). Bei Verletzungen innerhalb des

Canalis facialis distal des Ggl. geniculi kann es, je nach Höhe der Läsion, zusätzlich zur einseitigen Gesichtslähmung zu Schmeckstörungen, abnehmender Speichelsekretion und Hyperakusis kommen. Läsionen proximal dem Ggl. geniculi komplettieren die Symptomatik mit einer zusätzlich beeinträchtigten Tränensekretion (May 1970, Dawidowsky et al. 2011).

1.5 Pathophysiologie der Defektheilung des N. facialis

Die Axotomie peripherer Nerven löst eine retrograde Axonreaktion aus, welche reaktive Prozesse im korrespondierenden Kerngebiet in Gang setzt (Lieberman 1971, Soreide 1981). Der Grund hierfür ist die notwendige Umstellung auf nervenregeneratorische Biosyntheseschritte innerhalb der betroffenen Motoneurone (Streit et al. 1998, Plunet et al. 2002). Einer dieser reaktiven Mechanismen ist das sogenannte synaptische Stripping durch Astrozyten und Mikrogliazellen. Diese Zellen formieren sich um die Motoneuron-Perikarya und ziehen mit ihren Ausläufern bis in die synaptischen Spalten, um die Neurotransmission zu blockieren (Graeber et al. 1993). Bei Untersuchungen im Facialiskerngebiet nach FFA ist die Mikrogliose eine Woche nach Läsion am stärksten ausgeprägt, zeigt im Verlauf ein stetig regressives Verhalten und bleibt 2 Monate nach dem initialen Anstieg immer noch erhöht (Raslan et al. 2013). Eine Konsequenz des synaptischen Strippings ist zudem auch die Deafferenzierung des Facialiskerngebiets, da bis 2 Monate nach FFA eine Abnahme sowohl von exzitatorischen als auch inhibitorischen Terminalen innerhalb des Facialiskerngebiets nachgewiesen werden konnte. Dabei verschiebt sich zusätzlich das Verhältnis von exzitatorischen zu inhibitorischen Terminalen in Richtung der Inhibition (Raslan et al. 2013).

Axone können an der Stelle der Nervenläsion, aus der sie im Zuge der Regeneration wiederum 25 bis 50 Tochteraxone abgeben, während des Eintretens in die Hanke-Büngner'schen Bänder nicht mehr den richtigen Anschluss an den ursprünglichen Zielmuskel finden und rein zufällig in die peripheren Endäste einwachsen (Brushart und Seiler 1987, Guntinas-Lichius und Angelov 2008). Die Konsequenz ist zum einen der Verlust der myotopischen Organisation der Muskelinnervation, was sich durch retrograde Markierung peripherer Nervenäste im Facialiskern nachweisen lässt, und zum anderen ein dadurch zustande kommendes

Überangebot von Axonterminalen an den Muskelfasern (Guntinas-Lichius et al. 1997, Guntinas-Lichius et al. 2005). Diese fehl geleitete Reinnervation führt zur Ansteuerung verschiedenster Muskeln durch die Tochteraxone eines ursprünglichen Axons und äußert sich klinisch als Synkinesie (Guntinas-Lichius et al. 2000, Bendella et al. 2011). Ein weiteres Problem ist das Zustandekommen der Innervation einer motorischer Endplatten durch Axone mehrerer Motoneurone, was als terminale Aussprossung bezeichnet wird und zu einer unphysiologischen polyneuronalen Reinnervation führt (Rich und Lichtman 1989, Guntinas-Lichius et al. 2005, Guntinas-Lichius und Angelov 2008). Im Hinblick auf eine möglichst fehlerfreie Reinnervation wird vermutet, dass eine Unterdrückung der terminalen Aussprossung eine wesentliche Rolle für das klinische Benefit spielen muss, was im Gegensatz zur kollateralen Aussprossung nicht durch Antikörper gegen neurotrophische Faktoren beeinflusst werden kann (Guntinas-Lichius et al. 2005). Eine weitere Art der Defektheilung im Bereich des Facialisnervs ist das 1928 von dem russischen Neurologen Bogorad erstmals beschriebene Phänomen der Krokodilstränen (Bogorad 1979). Hierbei stellt sich während des Kauaktes eine abnorme Tränensekretion ein, auf dessen Seite es zu einer Ausbildung von Ephapsen zwischen Anteilen des N. intermedius und des N. petrosus superficialis major gekommen ist, wodurch parasymphatische Signale zur Speichelsekretion an die Tränendrüse fehlgeleitet werden (Savin 1939).

2. Ziele der Arbeit

Die retrograde Axonreaktion infolge einer Transektion des Facialisnervs ruft dramatische Reaktionen innerhalb des Facialiskerngebiets hervor. Zum einen tritt eine Mikrogliose auf, welche bis 2 Monate nach der Läsion noch nachweisbar bleibt. Deren weitere Dynamik ist aber noch unbekannt. Zum anderen setzt sowohl eine Atrophie des Facialiskerngebiets und eine Dysbalance zwischen inhibitorischen und exzitatorischen Terminalen im Kerngebiet ein, dessen Ausmaße bislang lediglich bis 2 Monate nach FFA nachbeobachtet wurden (Raslan 2009). Demnach sollte in der vorliegenden Arbeit analysiert werden, in wieweit quantitative Änderungen der Mikroglia, des Volumen des Kerngebiets und afferenter Signale zum Facialiskern 4 Monate nach FFA eintreten, um somit weitere Einblicke in den Verlauf der nukleären Reorganisation bekommen zu können. Mit immunhistochemischer Färbung der Cholin-Acetyltransferase wurde exploriert, ob und in welchem Ausmaß Änderungen der axosomatischen Synapsendichte cholinерger Afferenzen aufgetreten waren. Zudem sollte durch Untersuchungen glutamaterger und GABAerger axonaler Terminalen im Facialiskern aufgezeigt werden, ob reaktive Veränderungen der Afferenzen zum Facialiskern in ihrer Gesamtheit zu beobachten waren und ob sich im Verlauf der Nervenregeneration ein Übergewicht des exzitatorischen oder inhibitorischen Inputs eingestellt hatte.

Vier Monate nach FFA und der Scheinoperation wurde mittels Videoanalyse die Funktion der ipsilateralen Vibrissen untersucht und ermittelt, ob sich für Amplituden, Winkelgeschwindigkeit und Winkelbeschleunigung Unterschiede zwischen beiden Gruppen ergaben. Das Hauptaugenmerk sollte darauf liegen, den Grad der Beeinträchtigung der maximalen Amplitude aus Re- und Protraktion der Vibrissen beider Gruppen in Erfahrung zu bringen. Des Weiteren wurde in immunhistochemisch aufgearbeiteten Präparaten des M. levator labii superioris exploriert, ob Abnormalitäten in der Innervation der Muskelfasern, wie polyneuronal innervierte neuromuskuläre Endplatten, im Verlauf der Reinnervation der Muskulatur entstanden waren. Im Anschluss an die Zusammentragung der Daten sollte der Hypothese nachgegangen werden, ob sich das Level fehlinnervierter Endplatten in der Muskulatur auf die Schwere der funktionellen Einschränkung auswirkt.

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht (Raslan et al. 2013).

3. Material und Methodik

3.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden an 16 männlichen Wistar-Ratten (Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland) durchgeführt. Das Alter der Tiere betrug zu Beginn der Versuchsreihe 10 Wochen. Durch zufällige Verteilung wurden die Tiere in zwei Gruppen eingeteilt. In der einen Gruppe wurde der rechte Facialisnerv durchtrennt und unmittelbar anschließend mit einer facio-facialen Nerven-anastomose wieder koadaptiert (FFA, N=8). Bei den anderen Tieren, der Kontrollgruppe (KG), wurde der Nerv zwar freigelegt, blieb aber intakt (Scheinoperation; KG, N=8). Die Versuche wurden durch die Tierschutzkommission des Landes Thüringen geprüft und in Übereinkunft mit dem Tierschutzgesetz durchgeführt.

3.2 Operationstechnik

Die Narkotisierung der Ratten erfolgte durch intramuskuläre Applikation einer Dreikomponentenlösung aus Medetomidin (0.15 mg kg^{-1} , Domitor-R, Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland), Midazolam (2 mg kg^{-1} , Dormicum-R, Merckle GmbH, Blaubeuren, Deutschland) und Fentanyl (0.005 mg kg^{-1} , Fentanyl-R Janssen, Janssen, Neuss, Deutschland). Die facio-faciale Anastomose wurde von Dr. A. Irintchev und Dr. M. Finkensieper, Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Jena, operiert und gemäß eines standardisierten Protokolls durchgeführt (Tomov et al. 2002) (Abb. 1). Mit Sicht durch ein Operations-Mikroskop wurde der Hauptstamm des rechten N. facialis extratemporal frei präpariert und 2 mm nach Austritt aus dem Foramen stylomastoideum, distal des Abganges des N. auricularis posterior, durchtrennt. Nach Axotomie wurde der proximale Axonstumpf nahtlos mit dem distalen Stumpf koadaptiert. Eine Nerven-naht ist nicht notwendig. Diese Ergebnisse ohne Naht sind bei Ratten hinsichtlich Leitungsgeschwindigkeit, Axonzahl und Myelinscheidendicke mit den Ergebnissen mit Naht identisch (Starritt et al. 2011). Der Hautschnitt wurde mit drei bis vier Einzelknopfnähten (Ethicon, 4-0) verschlossen. Bei den acht Ratten

der Kontrollgruppe wurde der Hauptstamm des rechten Nervus facialis lediglich frei präpariert und anschließend die Haut ohne vorherige Axotomie wieder vernäht.

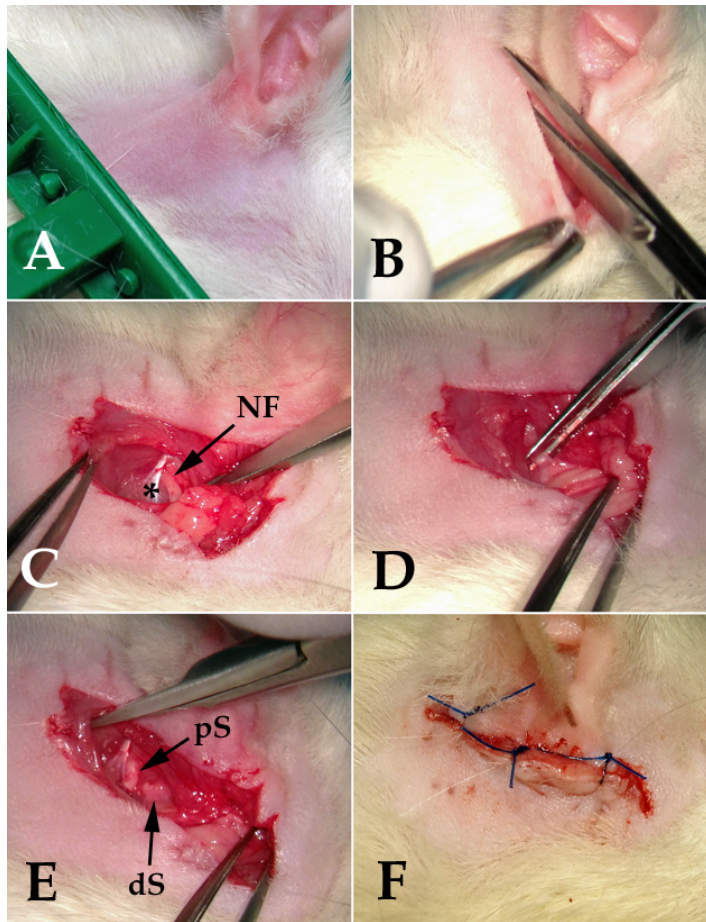


Abb.1 Operative Technik der facio-facialen Anastomose. Nachdem die Ratte narkotisiert war, wurde das Fell auf der rechten Seite sub- und retroauriculär abrasiert (Abb. A). Im Anschluss erfolgte die Präparation der Haut auf Höhe des Mastoids (Abb. B). Orientierend an der Sehne des Musculus digastricus, Venter posterior (*Stern* in Abb. C), konnte der Stamm der N. facialis (NF) distal seines Abganges vom N. auricularis posterior aufgesucht und freipräpariert werden (Abb. C). Anschließend wurde dieser mit einer Schere durchtrennt (Abb. D). Die Enden des proximalen (pS) und distalen Stumpfes (dS) wurden nahtlos koadaptiert (Abb. E) und die Wunde anschließend mit Einzelknopfnähten (Ethicon, 4-0) verschlossen (Abb. F).

Um den Erholungsprozess von der Narkose zu beschleunigen, ist den Ratten unmittelbar postoperativ eine Dreikomponentenlösung der korrespondierenden Antidots aus Antipamezol (0.75 mg kg^{-1} , Antisedan-R, Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland), Flumazenil (0.2 mg kg^{-1} , Anexate-R, Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland) und Naloxon (0.12 mg kg^{-1} , Naloxon, DeltaSelect GmbH, Pfullingen, Deutschland) subkutan appliziert worden.

3.3 Analyse des Ncl. n. facialis

Die histologische Aufarbeitung sowie Immunhistochemie und Stereologie wurde nach Vorgaben von Arbeiten von Irintchev et al. (2005) und Raslan et al. (2013) durchgeführt.

3.3.1 Gewebepräparation

Vier Monate nach der Operation wurden die Ratten durch intraperitoneale Applikation von Pentobarbital-Natrium ($0,73 \text{ g kg}^{-1}$, Narcoren, Merial GmbH, Halbergmoos, Deutschland) betäubt und anschließend mit 4% Formaldehyd in 0.1 M Kakodylat-Puffer, pH 7.3, bei Raumtemperatur für 10 min transkardial perfundiert (Abb. 2).

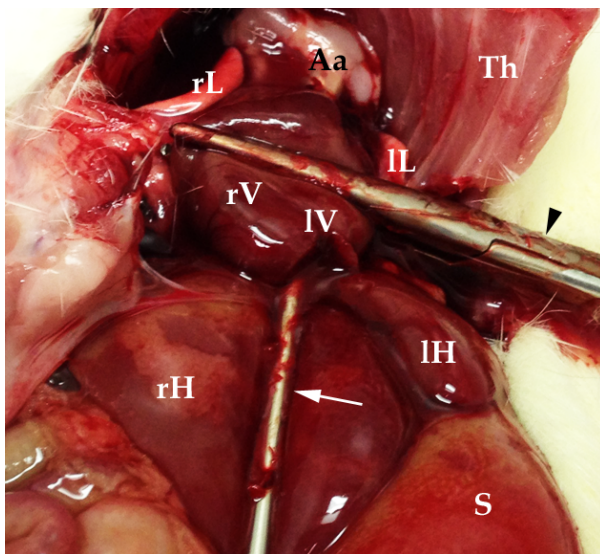


Abb.2 Transkardiale Perfusion einer Ratte mit 4% Formaldehyd-Lösung. Über eine Inzision des linken Ventrikels (IV) wurde die Kanüle (*Pfeil*) bis in die Aorta ascendens (Aa) vorgeschoben und durch eine Parazentese des rechten Vorhofes eine Abkopplung des großen vom kleinen Kreislauf hergestellt. Mithilfe einer Klemme (*Pfeilspitze*) wurde die Kanüle während der Perfusion für 10 min in ihrer Position fixiert. Rechter und linker Ventrikel (rV, lV), rechter und linker Lungenlappen (rL, lL), rechter und linker Leberlappen (rH, lH), Milz (S), und nach kranial mobilisierter Thorax (Th).

Das Gehirn mit Hirnstamm und zervikalem Rückenmark und die Musculi levatores labii superiores (LLS) beidseits wurden präpariert und über Nacht bei 4°C in der Perfusionslösung postfixiert. Das Gewebe wurde anschließend über drei Tage bei 4°C in 15% Saccharoselösung gelagert und anschließend durch zweiminütiges Eintauchen in -80°C vorgekühltes 2-Methyl-Butan eingefroren. Das Schneiden der Präparate erfolgte an einem Gefriermikrotom (CM3050, Leica, Nussloch, Deutschland) in transversaler Ebene seriell von rostral nach kaudal in einer Dicke von $25 \mu\text{m}$, um einen ausreichenden dreidimensionalen Raum für die

Analyse der Präparate mit der Disektor-Methode (s. 3.3.4) zu erreichen. Die Schnitte wurden anschließend auf Objektträgern (Superfrost Plus, Menzel, Braunschweig, Deutschland) in einer festgelegten Reihenfolge aufgebracht, so dass auf jedem Objektträger sechs bis acht koronare Schnittbilder in 250 µm breiten Abständen durch den Hirnstamm zu betrachten waren (Abb. 3). Die Objektträger wurden bei -20°C gelagert.

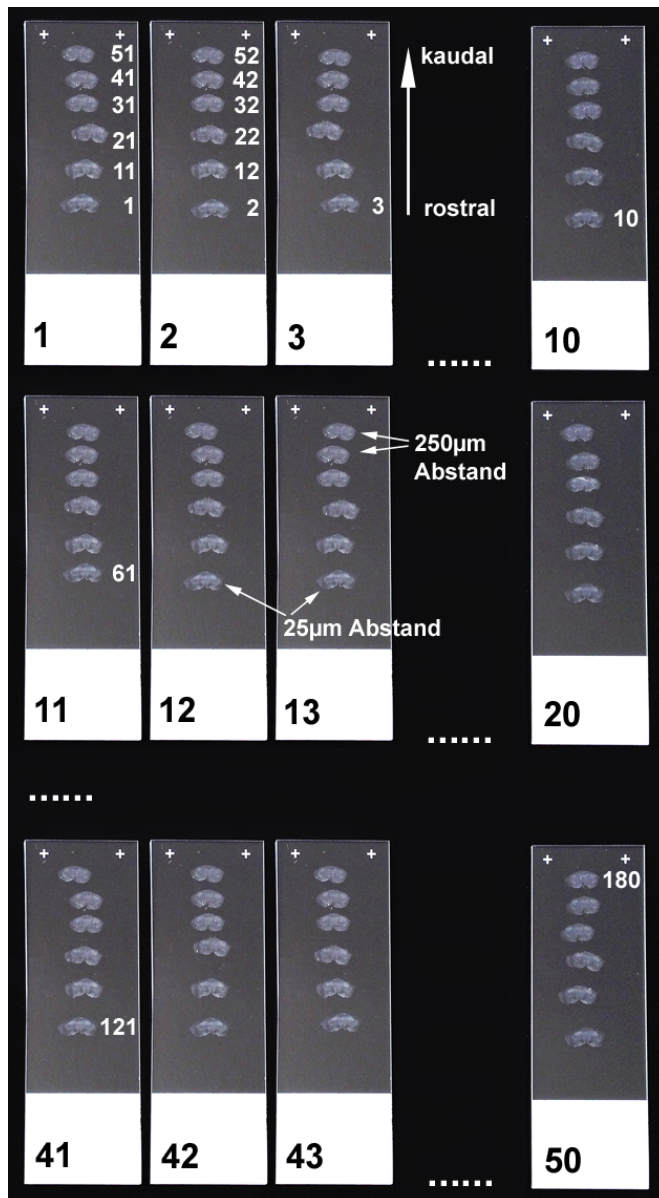


Abb.3 Verteilung der koronaren Gefrierschnitte auf den Objektträgern. Während des Schneidevorgangs am Gefriermikrotom wurden die Schnitte fortlaufend auf zehn Objektträgern in der Art und Weise gesammelt, dass die Präparate nach jedem zehnten Schnitt wieder auf dem ersten Objektträger begonnen wurden aufzubringen bis die Kapazität aller zehn Objektträger erschöpft war. Im optimalen Fall war auf zehn Objektträgern somit Platz für 60 Schnitte. Die folgenden Schnitte wurden analog auf den nächsten zehn Objektträgern gesammelt. Aufgrund der 25 µm dicken Schnitte und der Reihenfolge des Sammelns erfolgte die Darstellung des Hirnstamms auf jedem Objektträger in 250 µm großen Abständen mit der rostralen Orientierung Richtung beschrifteten Mattrand der Objektträger.

3.3.2 Antikörper

Die folgenden primären Antikörper und Verdünnungen wurden verwendet: Polyklonale Anti-Cholin-Acetyltransferase-Antikörper aus der Ziege (ChAT, 1:500; Millipore, Schwalbach, Deutschland), monoklonale Anti-Vesikulärer-GABA-Transporter-IgG3 aus der Maus (VGAT, 1:500; Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland), polyklonale Anti-Vesikulärer-Glutamat-Transporter-2-Antikörper aus dem Kaninchen (VGLUT2, 1:1000; Synaptic Systems) und polyklonale Anti-Ionisiertes-Calcium-bindendes-Adapter-Molekül-1-Antikörper aus dem Kaninchen (Iba-1, 1:1500, Wako Chemicals, Neuss, Deutschland). Zur Detektion der primären Antikörper wurden Cy-3-(Indocarbocyanin) konjugierte Anti-Ziegen-Antikörper vom Esel und Anti-Maus- und Anti-Kaninchen-Antikörper von der Ziege verwendet (Jackson ImmunoResearch Europe, Suffolk, UK) (Tab.1, Anhang). Zur Färbung des Kerngebiets wurde ein grün fluoreszierender Nissl-Farbstoff (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) eingesetzt. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit Hilfe von normalen Ziegen- und Esel-Serum (Jackson ImmunoResearch) geblockt. Die primären und sekundären Antikörper wurden in 0.5% λ -Carrageenan (Fluka, Steinheim, Deutschland) mit PBS und 0,02% Natriumazid, pH 7.3, gelöst.

3.3.3 Immunhistochemische Färbung

Zur Vorbereitung der immunhistochemischen Färbung wurden die bei -20°C gelagerten Objektträger über Nacht bei 37°C in einem Wärmeschrank getrocknet. Im Anschluss sind diese für 30 min bei 80°C in einer mit 0.01 M Natriumcitrat-Puffer gefüllten Glasküvette, pH 9.0, inkubiert wurden. Nach kurzem Abkühlen wurden die Objektträger in eine Glasküvette mit PBS gebracht. Zur Blockade freier Bindungsstellen sind die Objektträger anschließend für 2 Stunden in einer verschließbaren Küvette (Art.-Nr. 2306.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) bei Raumtemperatur in einer Lösung mit Normalserum, 0.2% Triton X-100 + 5% Normalserum + 0.02% Natriumazid in PBS, inkubiert wurden. Für die Verwendung des primären Antikörpers musste das jeweils oben genannte optimale Verdünnungsverhältnis in 0,5% λ -Carrageenan hergestellt werden. Die Objektträger wurden dann für 3 Tage bei 4°C in einer Küvette mit dem primären Antikörper

inkubiert. Letztendlich wurden die ungebundenen primären Antikörper mit PBS über 3 x 15 min vom Objektträger gespült. Die Verdünnung der sekundären Antikörper betrug 1:200 in 0,5% λ -Carrageenan mit PBS und 0,02% Natriumazid und die Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Die ungebundenen Reste des jeweiligen sekundären Antikörpers wurden gleichsam mit PBS über 3 x 15 min abgespült. Die Zellkerne wurden mit dem fluoreszierenden Nissl-Farbstoff gefärbt, welcher 1:200 in 0,5% λ -Carrageenan verdünnt wurde. Vorbereitend wurden die Ränder der Objektträger abgetrocknet und mit einem Fettstift umrandet (Liquid Blocker, PLANO). 200 bis 250 μ l der Lösung mit Nissl-Farbstoff wurden anschließend auf die Schnitte pipettiert, welche für 20 min bei Raumtemperatur in einer geschlossenen, feuchten Kammer inkubierten. Nachdem die überschüssige Nissl-Farblösung über 3 x 5 min mit PBS abgespült war, wurden die Objektträger mit Fluoromount-G (SouthernBiotech), einem nichtfluoreszierendem Einbettmedium, eingedeckelt und bei 4°C gelagert.

3.3.4 Stereologie

Zur quantitativen Analyse zellulärer Strukturen wurde die optische Disektor-Methode verwendet, die eine gute Reproduzierbarkeit bietet und somit die Beurteilung objektiver Daten ermöglicht (Gundersen et al. 1988, West et al. 1991). Das Zählen von Strukturen innerhalb der Schnitte erfolgte unter dem Mikroskop mithilfe eines dreidimensionalen Gerüsts, dem Disektor, dessen geometrische Parameter abhängig von der untersuchten zellulären Komponente variierten (Tab.2, Anhang). In Analogie zu einem dreidimensionalen kartesischen Koordinatensystem projizierte sich der Disektor mit Höhe und Breite auf x- und y-Achse und dehnte sich mit seiner Tiefe entlang der z-Achse aus, die sich zwischen der 25 μ m breiten Distanz von der vorderen zur hinteren Schnittfläche des Präparats erstreckte (Abb. 4). Diese Tiefenausdehnung des Disektors konnte mithilfe eines elektronisch gekoppelten Fokussierungsmessers kontrolliert werden (kleiner Pfeil in Abb. 4). Um Unebenheiten der Schnittoberflächen zu korrigieren, wurden die Disektoren in einem Abstand von 2 μ m zur Oberfläche des Präparates entlang der z-Achse in das Gewebe verschoben, so dass sich der Disektor innerhalb des 25 μ m dicken Gewebeschnittes befand. Dadurch konnte auch das artifiziell bedingte „Phänomen der verlorenen

Hauben“ (Hedreen 1998) während der Zellzählung vermieden werden, da somit nur angeschnittene Zellelemente nicht mehr sichtbar waren.

Zellen, die gezählt werden sollten, wurden nach stereologischen Regeln bewertet (West 1993): Solche Zellen, die sich innerhalb eines Disektors befanden oder die Akzeptanzlinie (grüne Linien in Abb. 4) „berührten“, wurden gezählt. Im Gegensatz dazu wurden die Zellen nicht gezählt, die die Verwerfungslinie (rote Linien in Abb. 4) „berührten“. Das Zählen von Synapsen, Axonterminalen und Zellen erfolgte unter der Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops (Axioskop 2 mot plus, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) mit motorisierter 3D-Tischbewegung, Filtersätzen für emittierendes Licht (grün – Filtersatz 10, Emission BP 515-565 und rot – Filtersatz 15, Emission LP 590, Carl-Zeiss, Jena, Deutschland), einer Quecksilber-Kurzbogen-Reflektor-Lampe (LQ-HXP 120, Carl Zeiss, Jena, Deutschland), einem joystickadaptierten Computersystem (Intel®Core™2 Duo CPU) und der Stereo Investigator 8 Software (MicroBrightField, Williston, Vermont, USA).

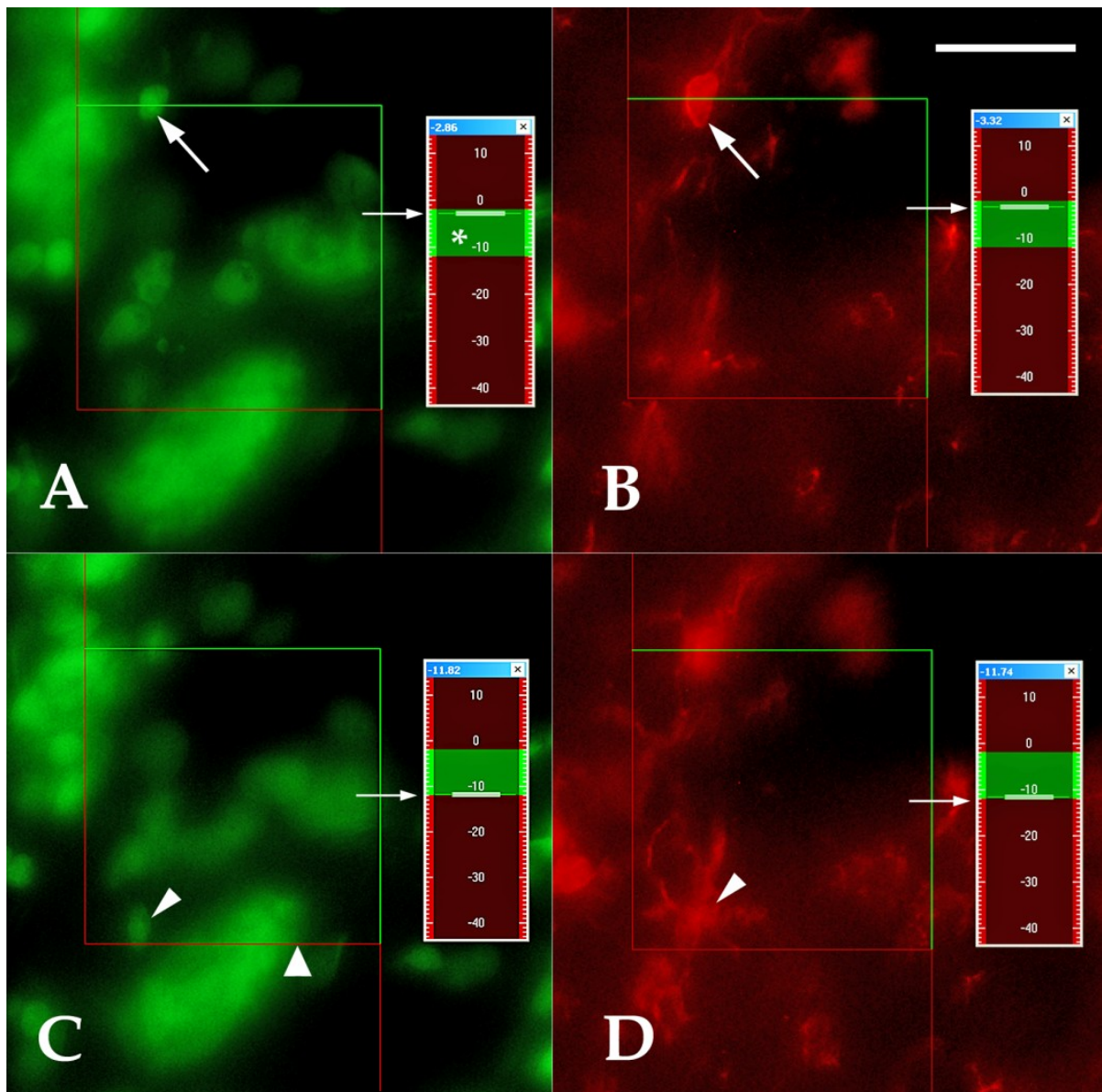


Abb.4 Zellzählung mittels der optischen Disektor-Methode. In den vier Abbildungen wird derselbe Bildausschnitt in Nissl- (Abb. A und C) und Iba1- (Abb. B und D) Färbung gezeigt, deren Unterschied lediglich im Fokus zwischen den Bildpaaren AB und CD liegt. Der Fokus innerhalb der 10 µm tiefen Ausdehnung des Disektors auf der z-Achse (Abb. A; *grüner Skalenbereich mit Stern*) wird durch den kleinen Pfeil an der Skala angezeigt. Demnach befindet sich in 1 µm Tiefe eine sowohl mit Nissl als auch mit Iba1 gefärbte Mikrogliazelle (Abb. A und B, *großer Pfeil*). Die Nissl-Färbung liefert anhand der Kerngrenzen eine Referenz dafür, dass die Mikrogliazelle durch das Berühren der grünen Akzeptanzlinie gezählt wird. Die Mikrogliazelle (*Pfeilkopf*) in 10 µm Tiefe (Abb. C und D) wird nicht gezählt, da der Kern in der Nissl-Färbung (Abb. C) die rote Verwerfungslinie (*dicker Pfeilkopf*) überschreitet. Weißer Balken = 25 µm.

3.3.4.1 Volumen

Um das Gesamtvolumen des Ncl. n. facialis zu ermitteln, wurde die Cavalieri-Methode benutzt (Howard 1998). Hierbei wurden zunächst die Flächeninhalte der einzelnen Kernschnitte von rostral nach kaudal stereologisch bestimmt, indem die Kerngrenzen markiert wurden (Abb. 5). Schließlich konnte unter Berücksichtigung des Abstands von 250 µm zwischen den Schnitten das Kernvolumen berechnet werden [1] (Abb. 6). V war das Volumen des Ncl. n. facialis, $\Sigma(A)$ die Summe aller von rostral nach kaudal ermittelten Flächeninhalte und t der Abstand zwischen den Ebenen.

$$V = \sum (A) \times t \quad [1]$$

3.3.4.2 Motoneurone

Aufgrund der charakteristischen Morphologie der Motoneurone des Ncl. n. facialis wurde die fluoreszierende Nissl-Färbung zur stereologischen Zellzählung verwendet (Abb. 5). Hierbei wurden 100 x 100 x 10 µm große Disektoren ohne Zwischenabstand benutzt, sodass alle Zellen pro Schnitt erfasst und die Gesamtzahl aller Motoneurone eines Kernareals bestimmt werden konnten.

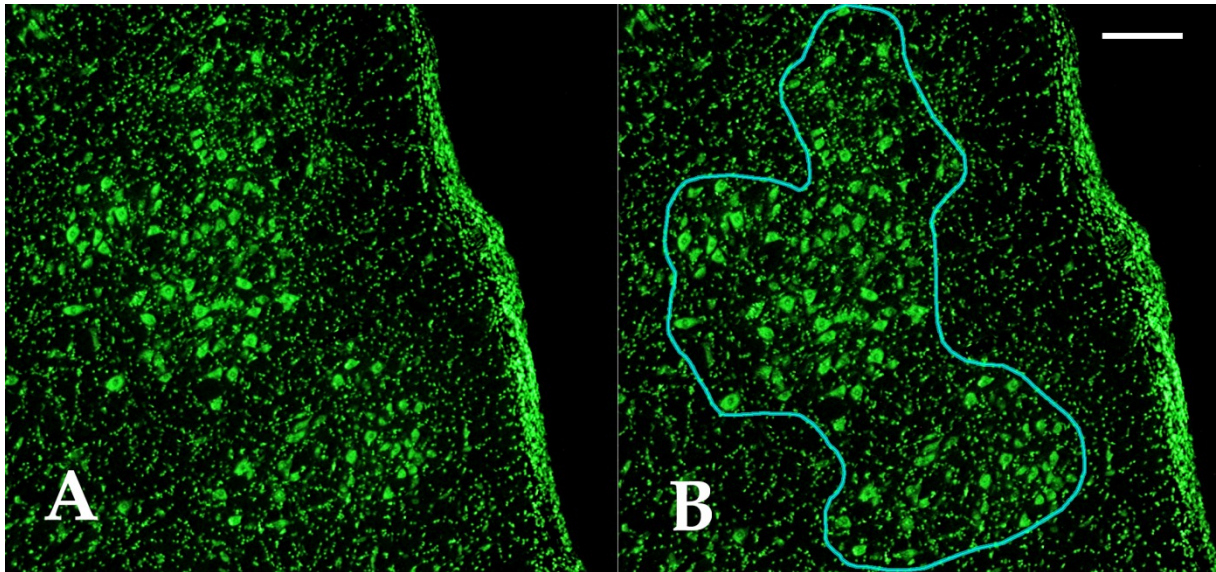


Abb.5 Fluoreszierende Nissl-Färbung des Ncl. n. facialis. Zu sehen ist ein koronarer Schnitt durch den Hirnstamm einer Ratte der Kontrollgruppe (Abb. A). Das durch die Motoneurone gebildete Areal des Ncl. n. facialis desselben Schnittbildes wurde mit einem Kurser markiert (Abb. B), wodurch anschließend der Flächeninhalt stereologisch bestimmt werden konnte. Weißer Balken = 200 μ m.

3.3.4.3 Iba1

Ionisiertes-Calcium-bindendes-Adaptormolekül-1 (Iba1) ist ein Protein, das vor allem in aktivierten Mikrogliazellen hochreguliert synthetisiert wird (Yamada et al. 2006). Neben entzündlichen Prozessen im ZNS ist auch eine periphere Axotomie für die Aktivierung von Mikrogliazellen verantwortlich (Barron et al. 1990, Kreutzberg 1996), da diese das Überleben und die Regeneration der Motoneurone mit beeinflussen (Aldskogius 2011). Für die Analyse der Mikrogliazellen wurden Antikörper gegen Iba1 benutzt (s. 3.3.2). Zur Analyse wurden die Disektoren auf eine Größe von 60 x 60 x 10 μ m mit Abständen von 200 μ m definiert. Die Zellzählung erfolgte unter 40x Objektivvergrößerung. Zur Verifizierung der gefärbten Strukturen wurde die Nissl-Färbung zum Nachweis vorhandener Kerne in den Mikrogliazellen herangezogen. Um den Fehler zu minimieren, wurden jeweils zwei Ränder der Disektoren als Akzeptanz- und Verwerfungslinien definiert, sodass festgelegt war, ob Nissl-gefärbte Zellkerne, die diese Linien übertraten, für denjenigen Disektor gezählt wurden oder nicht (Abb. 4).

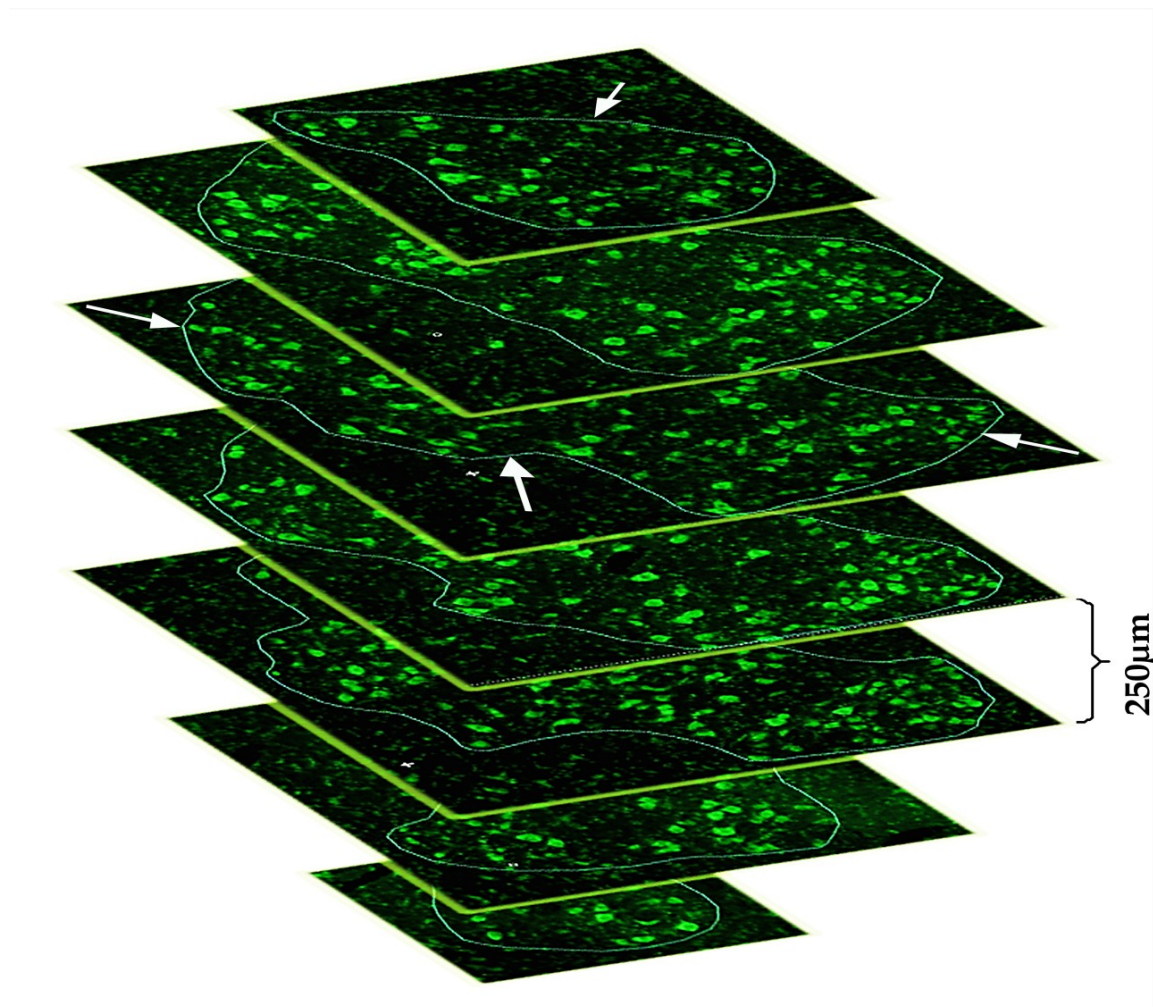


Abb.6 Volumenbestimmung nach Cavalieri. Die graphische Darstellung zeigt sieben Nissl-gefärbte parallele Schnitte durch den Ncl. n. facialis einer Ratte in jeweils 5x Objektivergrößerung. Die Kerngrenzen wurden markiert (*Pfeile*) und die Schnitte symbolisch übereinander projiziert, um die 250 μm breiten Abstände zwischen den nur 25 μm dicken Gefrierschnitten zu verdeutlichen. Voraussetzung für die Anwendung des Prinzips nach Cavalieri zur Volumenbestimmung waren Flächeninhalte, deren Ebenen parallel zueinander lagen und einen vorgegebenen Abstand zueinander hatten (Sonmez et al. 2010).

3.3.4.4 VGLUT2

Anhand der immunhistochemischen Färbung der vesikulären Glutamat-Transporter-2 (VGLUT2), welche transmembranär in Vesikeln glutamaterger Axonterminalen lokalisiert sind, konnten eingehende afferente Terminale von exzitatorischen Prämotoneuronen quantifiziert werden (Fanardjian et al. 1983). Hierfür wurden die Disektoren auf 10 x 10 x 5 μm normiert und der Abstand auf 250 μm festgelegt. Die Terminalen wurden unter Ölimmersionsmikroskopie in 100x Objektivergrößerung ausgezählt (Abb. 7).

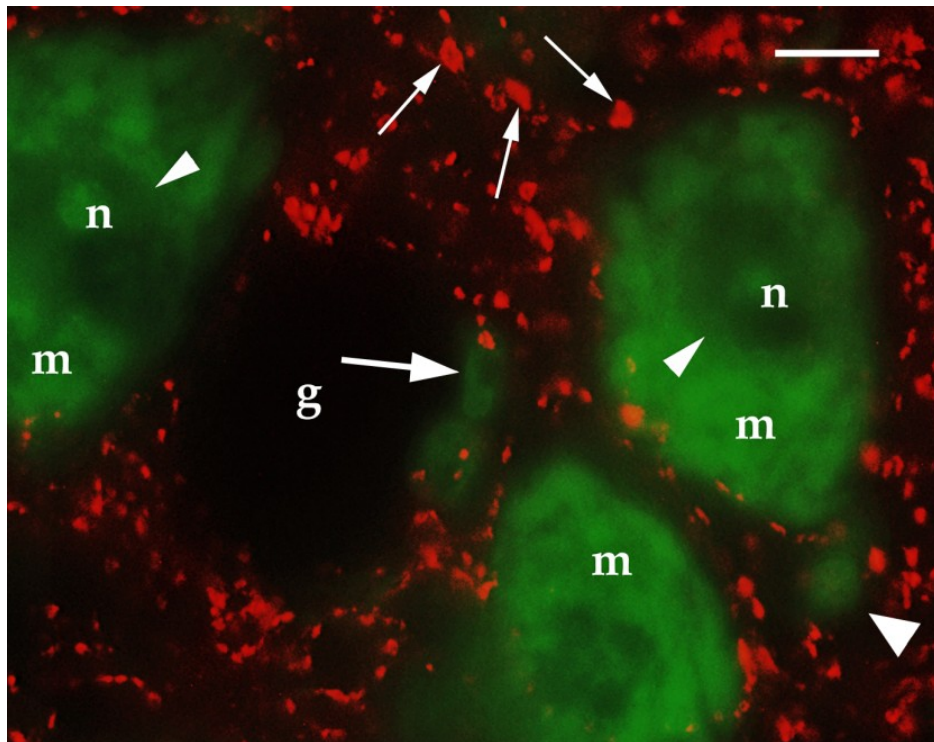


Abb.7 Analyse VGLUT2⁺ Terminale. Ausschnitt des Ncl. n. facialis einer Ratte der Kontrollgruppe in einer Doppelfärbung mit Nissl und VGLUT2. Um drei Motoneurone sind zahlreiche rote Punkte verteilt, die glutamatergen Axonterminalen entsprechen (*Pfeile*). Nicht angefärbtes Gefäß (*g*) mit Endothelzellkern (*dicke Pfeil*). Kerne weiterer Zellen (*dicke Pfeilspitze*). Motoneurone (*m*) und Nucleoli (*n*) innerhalb der vom Zellplasma dunkel abgegrenzten Zellkerne (*Pfeilspitzen*). Weißer Balken = 10 μm.

3.3.4.5 VGAT

Der vesikuläre GABA-Transporter (VGAT) befindet sich transmembranär in Vesikeln inhibitorischer Axonterminalen (McIntire et al. 1997). Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten VGAT⁺ Terminalen im Ncl. n. facialis erfolgte analog derer von VGLUT2 (s. 3.3.4.4).

3.3.4.6 ChAT

Cholin-Acetyltransferase (ChAT) ist ein Enzym, das in acetylcholinergen Neuronen synthetisiert wird und für die Katalyse der Biosynthese von Acetylcholin zuständig ist (Cullheim et al. 1977). Zur Quantifizierung perisomatischer, cholinergischer Präsynapsen wurden zunächst die Grenzen der mit Nissl-gefärbten Motoneurone markiert und

somit stereologisch deren Umfang bestimmt. Anschließend wurden die immunhistochemisch gefärbten ChAT⁺ Terminalen an jedem Perikaryon ausgezählt und somit die axosomatische Synapsendichte berechnet (Abb. 8).

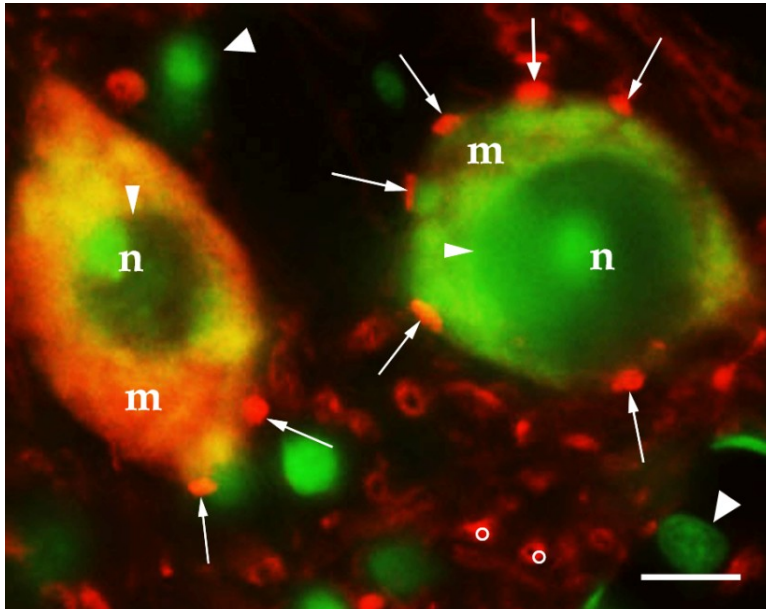


Abb.8 Analyse perisomatischer cholinerg (ChAT⁺) Synapsen. In einer Doppelfärbung mit Nissl und ChAT ist ein Ausschnitt des Ncl. n. facialis einer Ratte der Kontrollgruppe dargestellt. An den Perykaria der Motoneurone (*m*) sind rote Punkte angelagert, die cholinergen Präsynapsen entsprechen (*Pfeile*). Nucleoli (*n*) innerhalb der zum Plasma dunkler erscheinenden Zellkerne (*Pfeilspitzen*). Kerne anderer Zellen (*dicke Pfeilspitzen*). Weißer Balken = 10 µm.

3.3.4.7 Photodokumentation

Die Photographien ausgewählter Präparateausschnitte wurden mithilfe einer an das Axioskop 2 Mikroskop gekoppelten Digitalkamera CX9000 (MicroBrightField, Williston, Vermont, USA) angefertigt. Die digitale Nachbearbeitung erfolgte unter der Verwendung der Adobe Photoshop Elements 6.0 Software (Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

3.4 Analyse der Vibrissenbewegungen

Die Analyse der Vibrissenbewegungen erfolgte nach Tomov et al. (2002). Am dritten und zweiten Tag vor transkardialer Perfusion der Ratten mit Paraformaldehyd wurden Videoaufnahmen angefertigt, um eine funktionelle Wiederherstellung anhand der Vibrissenbewegung 4 Monate nach der Operation zu dokumentieren und beurteilen zu können. Für eine genauere Darstellung der Vibrissen wurden diese zum Teil manuell so abgeschnitten, dass jeweils auf beiden Seiten nur noch die größten beiden Vibrissen (C2-3) stehen blieben (Abb. 9AC). Während der Videoaufnahme wurde der Rattenkopf axial eingestellt, damit sich die Vibrissen nahezu vollständig entlang der Horizontalebene auslenken konnten. Die Aufzeichnungen erfolgten mit einer digitalen Videokamera (Pike F-032C, Allied Vision Technologies (AVT), Stadtroda, Deutschland). Anhand einer Bewegungsanalysesoftware (SIMI Reality Motion Systems GmbH, Version 7.5) konnte der Datensatz aus den Videoaufnahmen in Parameter eines kartesischen Koordinatensystems umgerechnet werden. Dafür wurden in jeweils 100 Frame langen Sequenzen (1 Frame = 10 ms) Bildpunkte in jedem einzelnen Frame definiert, welche insgesamt fünf Geraden bilden sollten: eine zwischen den medialen Augenwinkeln und vier als Projektion auf die Vibrissen (Abb. 9). Als Resultat entstanden für jeden Frame die jeweiligen x- und y-Koordinaten der definierten Bildpunkte.

3.4.1 Amplitude, Winkelgeschwindigkeit und Winkelbeschleunigung

Die Geraden, welche durch jeweils zwei Bildpunkte am Rattenkopf definiert waren und mittels der Bewegungsanalysesoftware in die Parameter eines kartesischen Koordinatensystems umgewandelt wurden, konnten anschließend zur Berechnung der physikalischen Parameter des Interesses als Verbindungsvektoren betrachtet werden [2].

$$\overrightarrow{AA'} = \vec{a} = \begin{pmatrix} x_2 - x_1 \\ y_2 - y_1 \end{pmatrix} \quad [2]$$

Bei diesen Parametern handelte es sich um die maximale Amplitude, die maximale Winkelgeschwindigkeit und die maximale Winkelbeschleunigung, die durch die repetitive Bewegung der Vibrissen erreicht wurde. Um die Amplitude der Vibrissenauslenkung bestimmen zu können, musste zunächst in jedem Frame der Winkel (φ) zwischen den einzelnen Vibrissenvektoren und dem Vektor (\vec{s}), der orthogonal zum Augenvektor (\vec{e}) stand, berechnet werden (Abb. 9BD). Die Berechnung dieses Winkels, gebildet durch Vibrissenvektor (\vec{a}) und dem Vektor (\vec{s}), ist beispielhaft in [3] dargestellt. Durch Subtraktion des Winkels bei maximaler Retraktion (φ_r) mit dem Winkel bei maximaler Protraktion (φ_p), konnte die Amplitude in der zweidimensionalen Ebene ermittelt werden.

$$\cos \varphi = \frac{\vec{a} \times \vec{s}}{|\vec{a}| \times |\vec{s}|} = \frac{axsx + aysy}{\sqrt{ax^2 + ay^2} \times \sqrt{sx^2 + sy^2}} \quad [3]$$

Zur Berechnung der maximalen Winkelgeschwindigkeit (ω) der Vibrissen wurde die differentielle Änderung eines Winkels ($d\varphi$) im Verlauf der hierfür benötigten differentiellen Zeitänderung (dt) bestimmt und anschließend der größte Wert ermittelt [4].

$$\omega = \frac{d\varphi}{dt} \quad \left(\frac{\text{rad}}{\text{s}} \right) \quad [4]$$

Die maximale Winkelbeschleunigung (a), welche die Vibrissen erreichen konnten, wurde durch die differentielle Änderung der Winkelgeschwindigkeit ($d\omega$) über die differentielle Änderung der Zeit (dt) berechnet [5].

$$a = \frac{d\omega}{dt} \quad \left(\frac{\text{rad}}{\text{s}^2} \right) \quad [5]$$

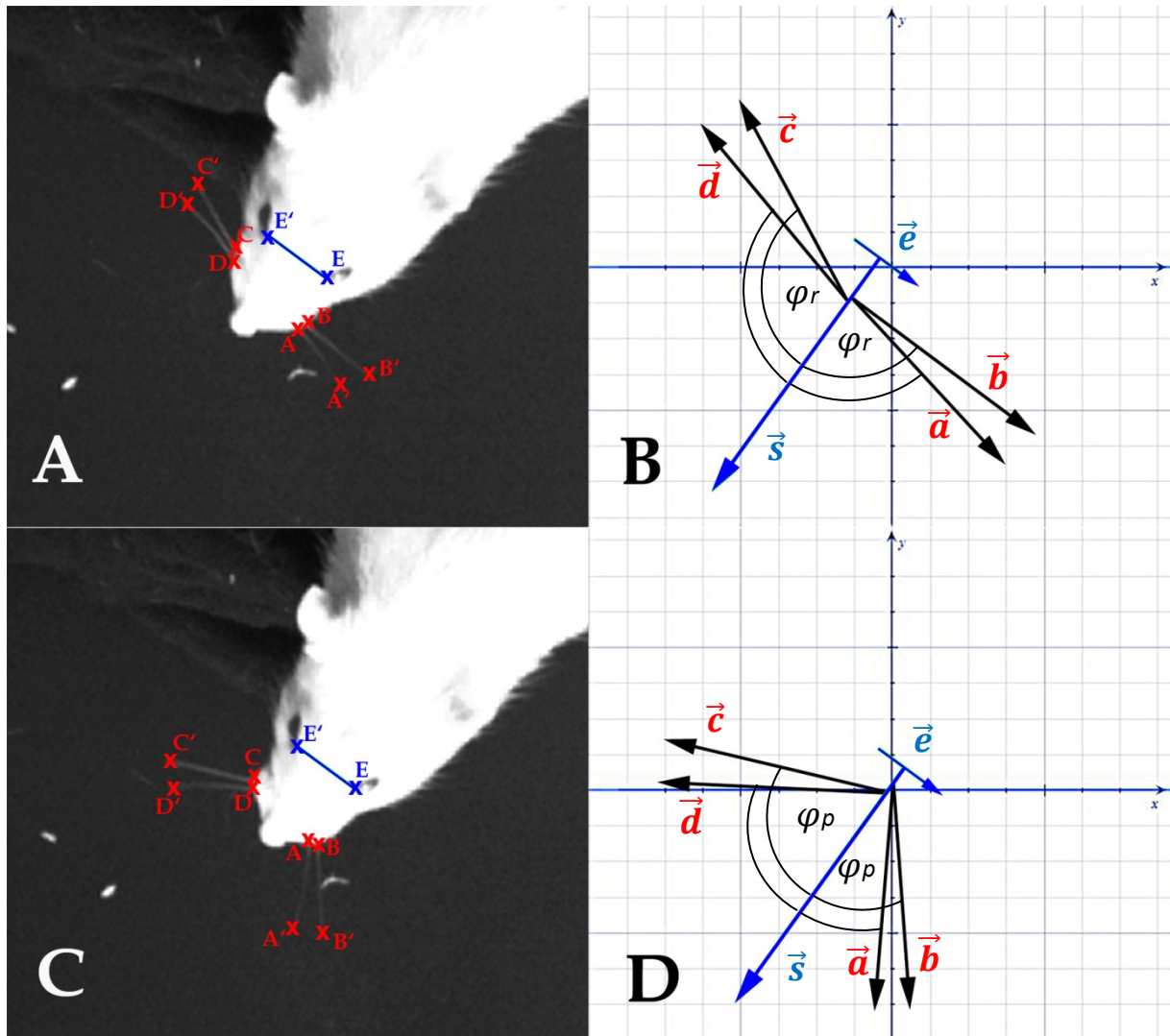


Abb.9 Analyse der motorischen Vibrissenfunktion. Die Abbildungen A und C zeigen Frameausschnitte der Videoanalysen, auf denen dieselbe Ratte vier Monate nach Intervention axial abgebildet ist. Die definierten Bildpunkte für die medialen Augenwinkel (*blau*) und die Vibrissen (*rot*) sind markiert. Abbildung A zeigt die Vibrissen in maximaler Retraktion und Abbildung C in maximaler Protraktion. Mithilfe der kinematischen Videoanalyse wurden die zweidimensionalen Koordinaten der Bildpunkte bestimmt, die zur weiteren Vektorrechnung genutzt wurden. Die zu den Abbildungen A und C korrespondierenden vektoriellen Darstellungen in den Abbildungen B und D sind in einem kartesischen Koordinatensystem dargestellt. Die Winkel bei maximaler Retraktion (φ_r) und maximaler Protraktion (φ_p) zwischen den Vibrissenvektoren \vec{a} , \vec{b} , \vec{c} , \vec{d} und dem orthogonalen Vektor \vec{s} zum Augenverbindungsvektor \vec{e} wurden bestimmt und aus deren Differenz die Amplitude jeder Seite berechnet.

Für Korrelationsanalysen zwischen den kinematischen Daten und mikrostrukturellen Parametern, die anhand histologischer Untersuchungen des Hirnstamms und der mimischen Muskulatur erhoben wurden, konnte sich von Seiten

der Funktion auf die Werte der Amplituden beschränkt werden, da diese gut mit der Geschwindigkeit und Beschleunigung korrelierten ($r > 0.9$, Pearson-Korrelation).

3.5 Analyse muskulärer Reinnervation

Die Fehlleitung terminaler Axonkollateralen auf der geschädigten Seite führt zu einer Einschränkung der Wiederherstellung koordinierter Muskelaktivität (Angelov et al. 1999). Unter der Annahme, dass die Erholung der muskulären Störung mit einer Polyinnervation der motorischen Endplatten einhergeht, wurde nach einem Zusammenhang zwischen der Anzahl polyinnervierter motorischer Endplatten und der Leistung der Vibrissenbeweglichkeit gesucht. Als ein Bestandteil der äußeren Vibrissenmuskulatur wurde repräsentativ der M. levator labii superioris ausgewählt (Guntinas-Lichius et al. 2005). Zur Immunfluoreszenzfärbung für die intramuskulär verlaufenden Axone dienten Anti-Cholin-Acetyltransferase-Antikörper und für die motorischen Endplatten Alexa Fluor 488-konjugiertes α -Bungarotoxin (Abb. 10).

3.5.1 Gewebepreparation

Vier Monate nach der Operation wurden die Ratten durch oben genanntes Perfusionsverfahren (s. 3.3.1) fixiert. Unter einem chirurgischen Mikroskop wurde bei allen Tieren der rechte M. levator labii superioris präpariert und dieser über Nacht in der Perfusionslösung bei 4°C gelagert. Anschließend erfolgte eine Infiltrierung des Gewebes mit 15% Saccharose-Lösung für 3 Tage. Um ein schnittfestes Präparat zu gewinnen, wurde das Gewebe auf ein flüssiges Einbettmedium (O.C.T. Compound, Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Holland) gebracht, das anschließend in -80°C vorgekühltes 2-Methyl-Butan gebracht wurde und dadurch einen schneidbaren, festen Aggregatzustand annahm. Bis zum Schneideprozess wurden die Präparate in Messflaschen (Typ Vial, Art.-Nr. 0794.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in flüssigem Stickstoff gelagert. An einem Gefriermikrotom (CM3050, Leica, Nussloch, Deutschland) wurden 10 μ m dicke Schnitte in möglichst longitudinaler Ausrichtung der Muskelfasern angefertigt und diese anschließend seriell auf Objektträger (Superfrost Plus, Menzel) befördert.

3.5.2 Immunhistochemie

Der Ablauf der Objektträgervorbereitung bis zur zweistündigen Inkubation in Normalserum erfolgte analog der Immunhistochemie in Abschnitt 3.4.3, mit dem Unterschied, dass die Inkubation der Objektträger in Natriumcitrat-Puffer nicht bei 80°C, sondern bei 60°C stattfand, um die Bindung von α -Bungarotoxin an nikotinerge Acetylcholin-Rezeptorproteine (nAChR) nicht zu beeinträchtigen (A. Irintchev, persönliche Mitteilung). Daraufhin folgte für 3 Tage die Inkubation mit polyklonalen Anti-Cholin-Acetyltransferase-Antikörpern der Ziege (ChAT), 1:500 verdünnt in 0.5% λ -Carrageenan mit PBS und 0,02% Natriumazid, pH 7.3. Als nächstes wurden die Schnitte für 3 x 15 min in PBS gewaschen. Dann erfolgte für 2 Stunden die Inkubation mit Cy3-konjugierten Anti-Ziegen-IgG-Antikörpern vom Esel, 1:200 verdünnt in 0.5% Carrageenan mit PBS und 0.02% Natriumazid. Anschließend wurde die überschüssige Lösung für 3 x 15 min mit PBS abgespült. Die Färbung der postsynaptischen nAChR wurde bei allen Schnitten im Anschluss durch zweistündige Inkubation mit Alexa Fluor 488-konjugiertem α -Bungarotoxin (Molecular Probes, B-13422, Eugen, Oregon, USA) in der Verdünnung 1:2000 bei Raumtemperatur durchgeführt. Es folgte eine Spülung mit PBS über 3 x 15 min. Im Anschluss an die Kernfärbung mit Bis-Benzimid wurde für 3 x 5 min überschüssiges Agens abgewaschen und die Präparate auf den Objektträgern mit einem nicht fluoreszierenden Einbettmedium (Fluoromount-G, Southern Biotech) eingedeckelt und bei 4°C gelagert.

3.5.3 Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung

Die Analyse der Schnitte erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 2 mot plus, Carl-Zeiss, Jena, Deutschland) und den Filtersätzen für grün (Filtersatz 10, Emission BP 515-565, Carl-Zeiss, Jena, Deutschland) und rot emittierendes Licht (Filtersatz 15, Emission LP 590, Carl-Zeiss). Zur Interpretation der reinnervierten neuromuskulären Endplatten wurden standardisierte Kriterien benutzt anhand derer die Auszählung erfolgte (Guntinas-Lichius et al. 2005): Die Bezeichnung „monoinnerviert“ erhielten Endplatten, bei denen ein axonaler Eingang zu sehen war. „Polyinnervierte“ Endplatten waren solche, die zwei oder mehr axonale Eingänge

bzw. Ausgänge vorwiesen. Als „nicht-innervierte“ Endplatten wurden α -Bungarotoxin-gefärbte nAChR bezeichnet, die keine korrespondierenden Axonterminalen besaßen.

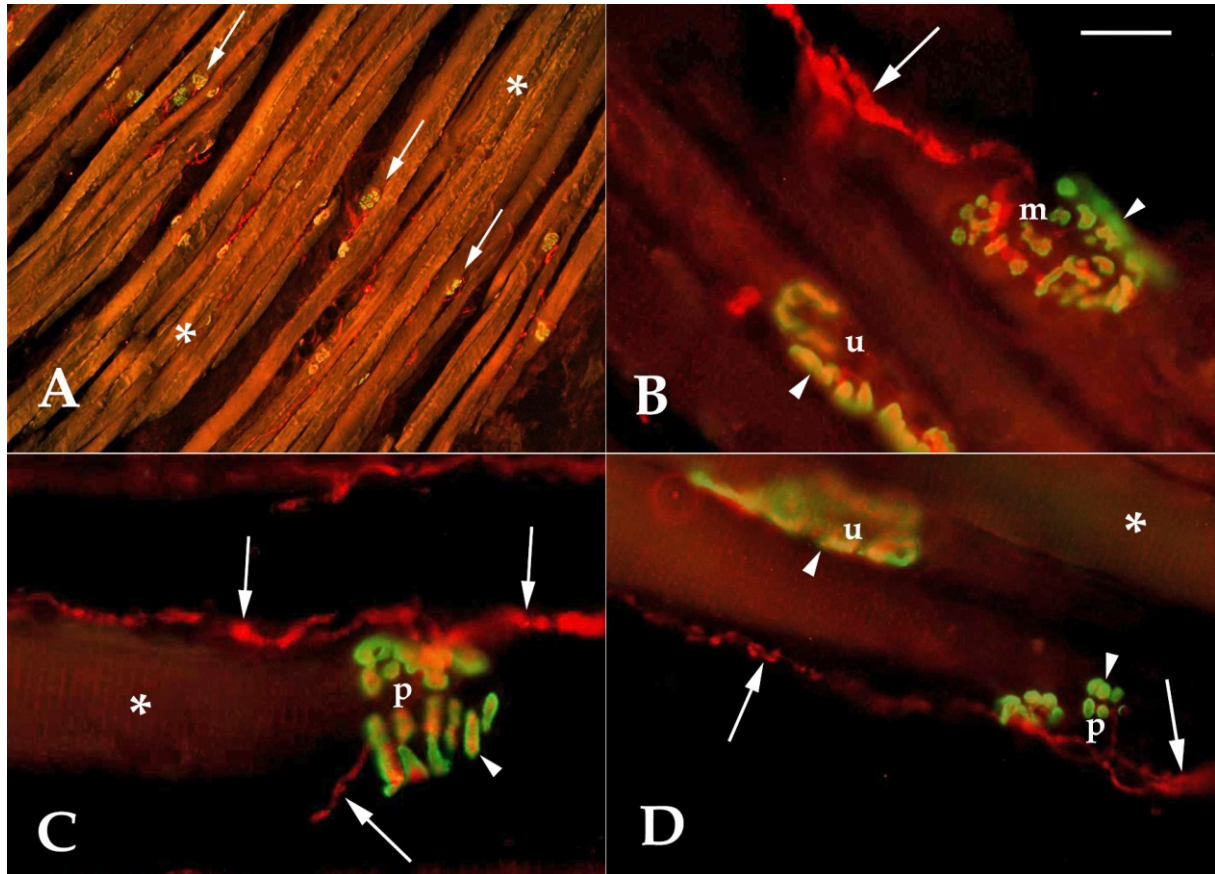


Abb.10 Analyse der Polyinnervation neuromuskulärer Endplatten. In den Abbildungen sind longitudinale Anschnitte durch den rechten Musculus levator labii superioris einer Ratte der FFA-Gruppe in einer Doppelfluoreszenzfärbung mit α -Bungarotoxin und ChAT zu sehen. Abbildung A verdeutlicht die relativ lineare Anordnung der neuromuskulären Endplatten (*Pfeile*) orthogonal zum Faserverlauf der Muskelfasern (*Sterne*). In den Abbildungen B, C und D sind verschiedene Innervationsmuster der neuromuskulären Endplatten zu sehen. Je nach Anzahl der eingesprossenen Axonterminalen (*große Pfeile*) in eine neuromuskuläre Endplatte (*Pfeilspitzen*) wurde die Kategorisierung in monoinnervierte Endplatten (*m*), polyinnervierte Endplatten (*p*) und „nicht-innervierte“ Endplatten vorgenommen. Waren Endplatten sowohl α -Bungarotoxin⁺ als auch ChAT⁺, hatten aber kein korrespondierendes Axon, wurden diese als „unklar“ (*u*) klassifiziert. Balken entspricht 100 μ m in Abb. A und 25 μ m in Abb. B, C und D.

3.6 Statistische Auswertung

Zum Vergleich zweier Gruppen von Tieren wurde der zweiseitige t-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Das Signifikanzniveau betrug 5%. Zur Analyse und graphischer Darstellung der Daten wurde die SigmaPlot 12.0 Software (Systat Software, San Jose, CA, USA) verwendet. Die Darstellung der Daten erfolgte anhand von Mittelwerten mit deren Standardfehlern (SEM, standard error of the mean).

4. Ergebnisse

4.1 Eine funktionelle Regeneration der Vibrissenmotorik ist limitiert

Nach einer zweimonatigen Regenerationszeit infolge facio-facialer Anastomose ist eine nur sehr begrenzte weitere funktionelle Erholung, anhand einer Analyse der Vibrissenbewegungen zu beobachten (Angelov et al. 2005, Guntinas-Lichius et al. 2005). Die Videoanalysen der Vibrissenbewegungen in der vorliegenden Arbeit zeigen nun, dass bei Ratten 4 Monate nach FFA eine signifikante Minderung der Amplitude auf 27% im Vergleich zu den ipsilateralen Vibrissen bei scheinooperierten Kontrolltieren ($20 \pm 3^\circ$ gegenüber $74 \pm 5^\circ$, $p < 0.001$, t-Test, Abb. 11) vorliegt. Die Geschwindigkeit und Beschleunigung der Vibrissen ipsilateral zur operierten Seite wiesen folglich ebenso signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen auf ($442 \pm 38 \text{ rad s}^{-1}$ gegenüber $2103 \pm 118 \text{ rad s}^{-1}$ und $42 \times 10^3 \text{ rad s}^{-2}$ gegenüber $142 \pm 8 \times 10^3 \text{ rad s}^{-2}$, $p < 0.001$, t-Test, Abb. 11). Die Ergebnisse sind vergleichbar mit der funktionellen Regeneration von Ratten 2 Monate nach FFA (Guntinas-Lichius et al. 2005), sodass aufgrund dieser Beobachtung der begrenzte Zeitraum, in der eine motorische Erholung nach erfolgter facio-facialer Anastomosen-Operation stattfinden kann, erhärtet wurde.

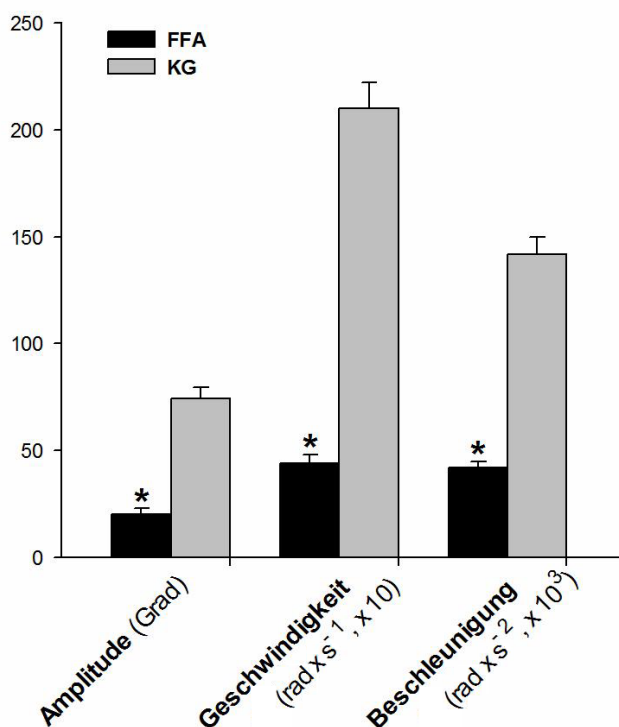


Abb.11 Analyse der motorischen Vibrissenfunktion von scheinooperierten Ratten der Kontrollgruppe (KG, graue Balken) und Ratten 4 Monate nach facio-facialer Anastomose (FFA, schwarze Balken). Dargestellt sind Mittelwerte mit deren Standardfehlern (SEM). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen sind mit Sternchen markiert ($p < 0.05$).

4.2 Abnahme exzitatorischer und Zunahme inhibitorischer Terminale

Um zu untersuchen, inwieweit Läsionen am N. facialis zu Veränderungen des exzitatorischen Inputs im Facialiskern führen, wurde die Anzahl glutamaterger Terminale 4 Monate nach FFA ermittelt. Diese Terminalen gehören zu Prämotoneuronen, welche Afferenzen vom Ncl. spinalis n. trigemini, Ncl. hypoglossus und der Formatio reticularis erhalten (Fanardjian et al. 1983, Eleore et al. 2005). Aufgrund der direkten deszendierenden corticofacialen Projektion beim Primaten sind Interneurone im Facialiskern nur spärlich bis gar nicht vorhanden (Sherwood 2005). Die Prämotoneurone synthetisieren zum Rücktransport von Glutamat in präsynaptische Vesikel den vesikulären Glutamat-Transporter-2, VGLUT2 (Kaneko et al. 2002), sodass die glutamatergen Terminalen im Facialiskern mittels Antikörper gegen VGLUT2 dargestellt werden können (Apostolova et al. 2006, Chen et al. 2010) (Abb. 12). Die Untersuchung der glutamatergen Innervation im Facialiskern erbrachte einen signifikanten Rückgang der Gesamtzahl VGLUT2⁺ Terminale bei Ratten 4 Monate nach FFA um -22% im Vergleich zu scheinooperierten Ratten der Kontrollgruppe (Abb. 13). Dieses Erkenntnis konnte bestätigen, dass die bereits nach einer Woche eintretende Reduktion VGLUT2⁺ Terminale im Kerngebiet des N. facialis (Raslan et al. 2013) in ihrer Quantität unverändert bleibt.

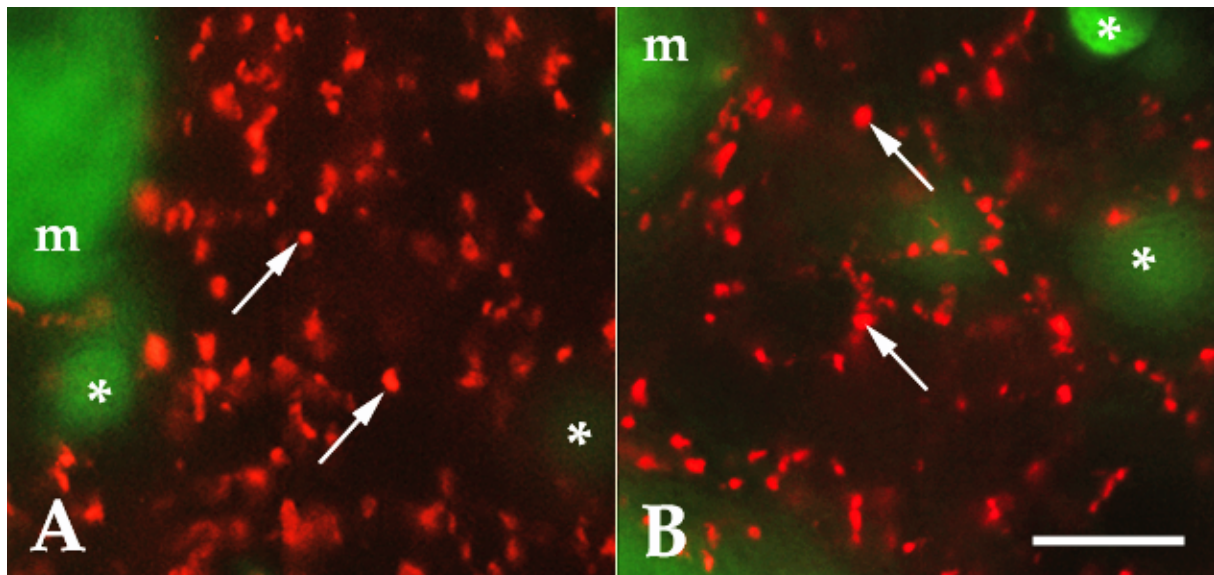


Abb.12 Darstellung von glutamatergen (VGLUT2⁺) Terminalen im Ncl. n. facialis. Mittels Ölimmersion sind zwei Ausschnitte in einer Doppelfärbung mit Nissl und VGLUT2 dargestellt. In Abbildung A sind ein Motoneuron (*m*) und VGLUT2⁺ Terminale (*Pfeile*) einer Ratte der Kontrollgruppe (KG) zu sehen. Abbildung B stammt von einer Ratte 4 Monate nach FFA. Kerne anderer Zellen (*Sternchen*). Weißer Balken = 10 µm.

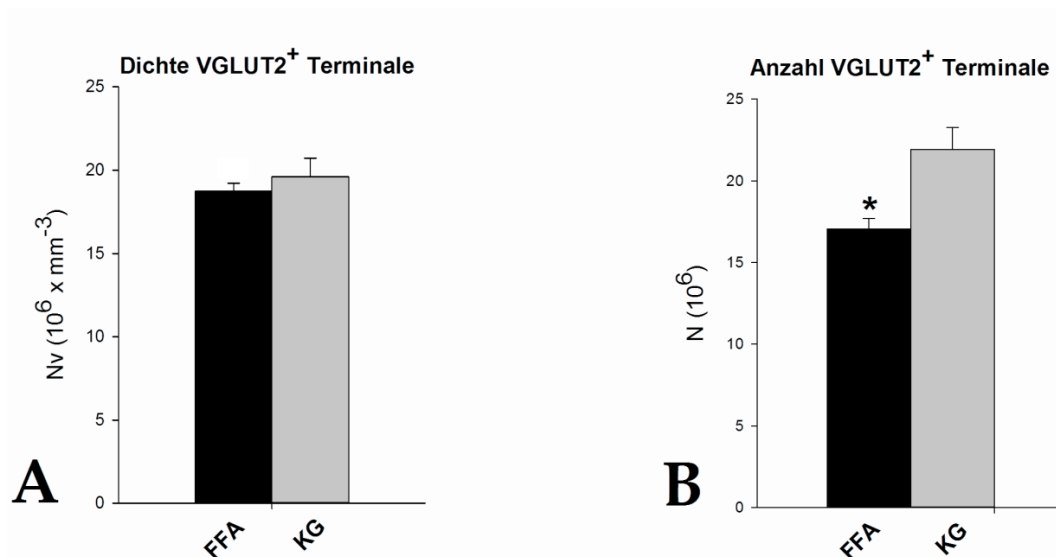


Abb.13 Analyse glutamaterger (VGLUT2⁺), exzitatorischer Terminale im Ncl. n. facialis. Die numerische Dichte (N_v in Abb. A) und die Anzahl (N in Abb. B) der VGLUT2⁺ Terminale sind für die Ratten der Kontrollgruppe (KG) und die Ratten 4 Monate nach FFA dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte mit deren Standardfehlern (SEM). Die Sternchen markieren signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($p < 0.05$).

Zur Analyse der Veränderungen inhibitorischer Synapsen im Facialiskern 4 Monate nach FFA wurden für die immunhistochemische Färbung fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen den vesikulären GABA-Transporter, VGAT, eingesetzt (Abb. 14). Anhand dieser Methode ist es möglich sowohl GABAerge als auch glycinerge Terminale darzustellen, da VGAT in beiden Neuronen exprimiert wird (McIntire et al. 1997, Chaudhry et al. 1998, Wang et al. 2009). Die Analysen zeigten, dass VGAT⁺ Terminale im Facialiskern ipsilateral zur FFA in ihrer Gesamtheit signifikant um +11% verglichen zu scheinputierten Kontrollratten zunahmen (Abb. 15). Somit konnte aufgezeigt werden, dass eine beobachtete Zunahme VGAT⁺ Terminale im Facialiskern ab der achten Woche nach FFA (Raslan et al. 2013) eine signifikante Progression erfährt. Diese Ergebnisse deuten nicht nur darauf hin, dass der exzitatorische Input der Motoneurone erheblich beeinträchtigt ist als der inhibitorische Input, sondern dass die inhibitorischen Terminalen im Verlauf der Nervenregeneration einen vermehrten Einfluss auf den Facialiskern ausüben. Analog dieser Auffassung war das Verhältnis exzitatorischer zu inhibitorischer Terminale 4 Monate nach FFA im Vergleich zu scheinputierten Tieren signifikant niedriger (0.92 ± 0.03 gegenüber 1.32 ± 0.09 , $p = 0.001$) und im Vergleich zum Zustand 2 Monate nach FFA (Raslan et al. 2013) um weitere 20% reduziert.

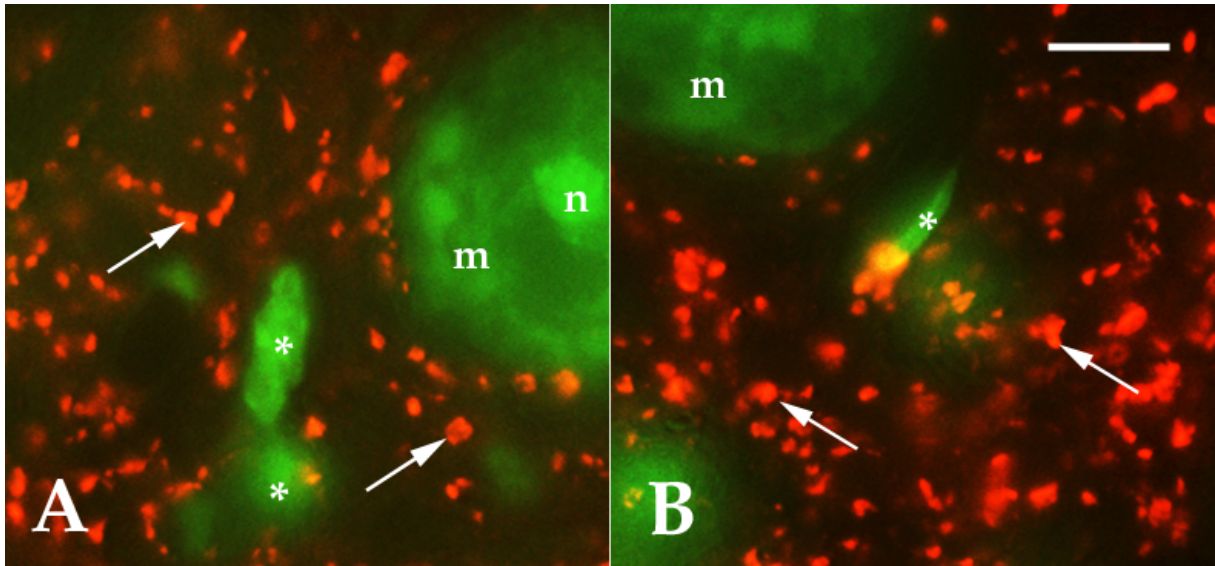


Abb.14 Darstellung von GABAergen (VGAT⁺) Terminalen im Ncl. n. facialis. Ausschnitte in einer Doppelfärbung mit Nissl und VGAT. Abb. A zeigt neben einem angeschnittenen Motoneuron (*m*) die VGAT⁺ Terminalen (*Pfeile*) bei einer Ratte der Kontrollgruppe (KG). Abb. B stammt von einer Ratte 4 Monate nach FFA. Nucleolus (*n*), Kerne anderer Zellen (*Sternchen*). Weißer Balken = 10 μ m.

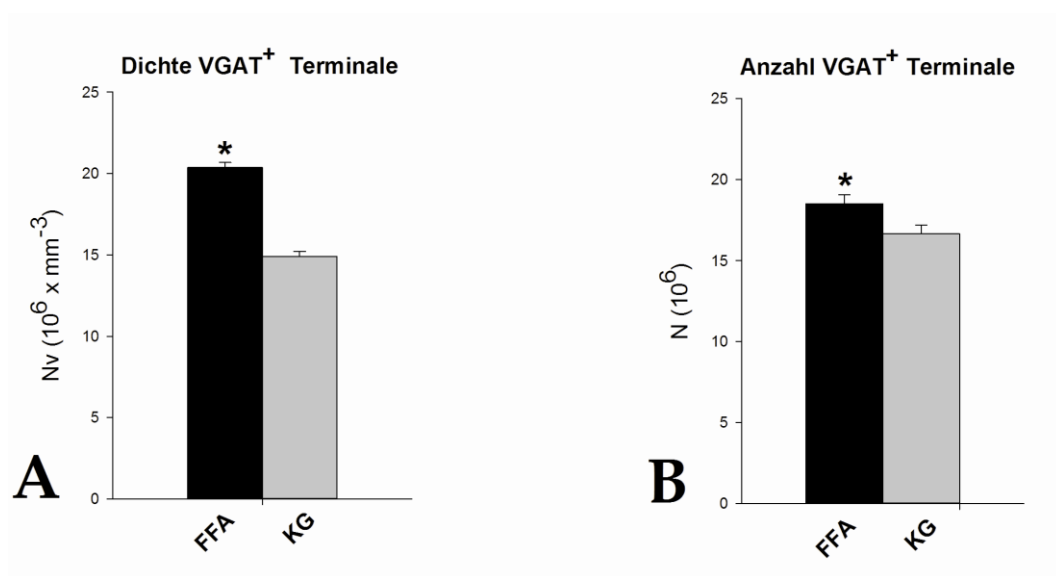


Abb.15 Analyse GABAerger (VGAT⁺), inhibitorischer Terminalen im Ncl. n. facialis. Die numerische Dichte (Nv in Abb. A) und die Anzahl (N in Abb. B) der VGAT⁺ Terminalen sind für die Ratten der Kontrollgruppe (KG) und die Ratten 4 Monate nach FFA dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte mit deren Standardfehlern (SEM). Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sind durch Sternchen markiert ($p < 0.05$).

4.3 Verlust motoneuronaler perisomatischer cholinerg Synapsen

Cholinerge Enzyme wie die Cholinacetyltransferase (ChAT) und Acetylcholinesterase (AChE) werden in Motoneuronen synthetisiert, da diese vorrangig über den Transmitter Acetylcholin an der neuromuskulären Endplatte agieren (Hoover und Hancock 1985). Allerdings besitzen diese Motoneurone an ihren Somata und Dendriten selbst postsynaptische M2-Muskarinrezeptoren, die von ChAT⁺ und AChE⁺ Terminalen vom C-Typ erreicht werden (Davidoff und Irintchev 1986, Hellstrom et al. 2003). Um Veränderungen des cholinerg regulierenden Inputs der Facialiskerne zwischen beiden Gruppen zu explorieren, wurde die Dichte perisomatischer ChAT⁺ Terminale, also die Synapsenanzahl pro Länge des Perikaryonumfangs der Motoneurone, bestimmt (Abb. 16).

Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der Synapsendichte bei Tieren 4 Monate nach FFA im Vergleich zur Kontrollgruppe um -42% (19 mm^{-1} gegenüber 33 mm^{-1} , $p < 0.001$, Abb. 17A). In der Größe der Motoneuron-Perikarya zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (Abb. 17B). Diese Ergebnisse offenbaren zum einen, dass faciale Motoneurone 4 Monate nach FFA signifikant geringer cholinerg innerviert werden und zum anderen, dass die perisomatischen cholinergen Synapsen im Vergleich zu 2 Monaten nach FFA (Raslan et al. 2013) weiter progredient abnehmen.

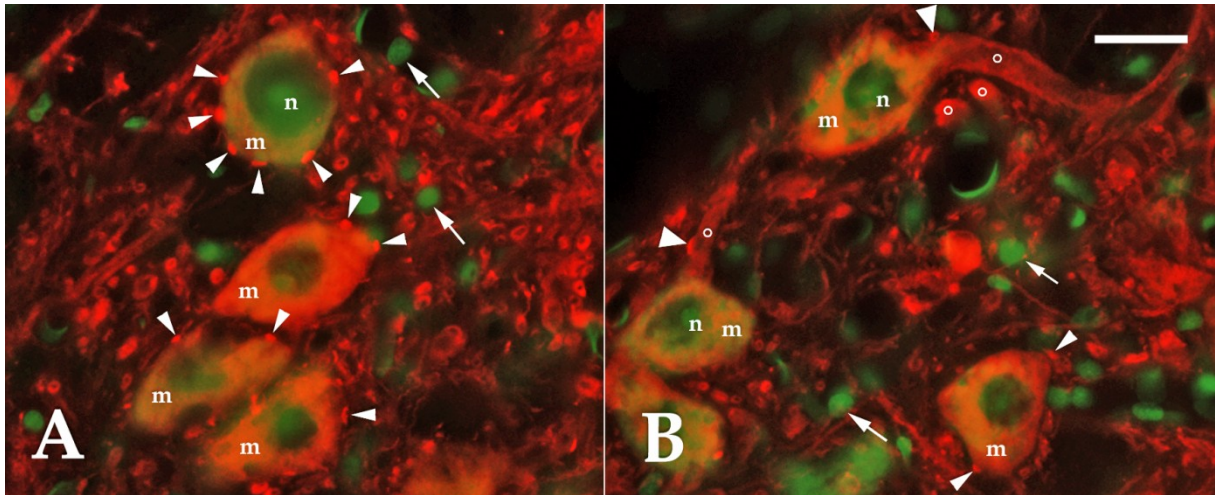


Abb.16 Darstellung von cholinergen (ChAT^+) Strukturen im Ncl. n. facialis. Die Abbildungen zeigen Ausschnitte in einer Doppelfärbung mit Nissl und ChAT. In Abbildung A sieht man die Anordnung ChAT^+ Axonterminale (*Pfeilspitzen*) um die Perikarya der vier Motoneurone (*m*) bei einer Ratte der Kontrollgruppe (KG). Abbildung B zeigt den Zustand bei einer Ratte 4 Monate nach FFA. Cholinerge Synapsen, die nicht axosomatisch, sondern an proximalen Dendriten orientiert waren (*dicke Pfeilköpfe* in Abb. B), zählen zwar ebenfalls zu den C-Typ-Terminalen (Hellstrom et al. 2003), wurden allerdings bei der Zählung nicht berücksichtigt. Kerne weiterer Zellen (*Pfeile*), Nucleoli der Zellkerne (*n*) innerhalb des zum Zellplasma dunkleren Zellkerns. Längs und quer angeschnittene Dendriten (*Kreise*). Weißer Balken = 25 μm .

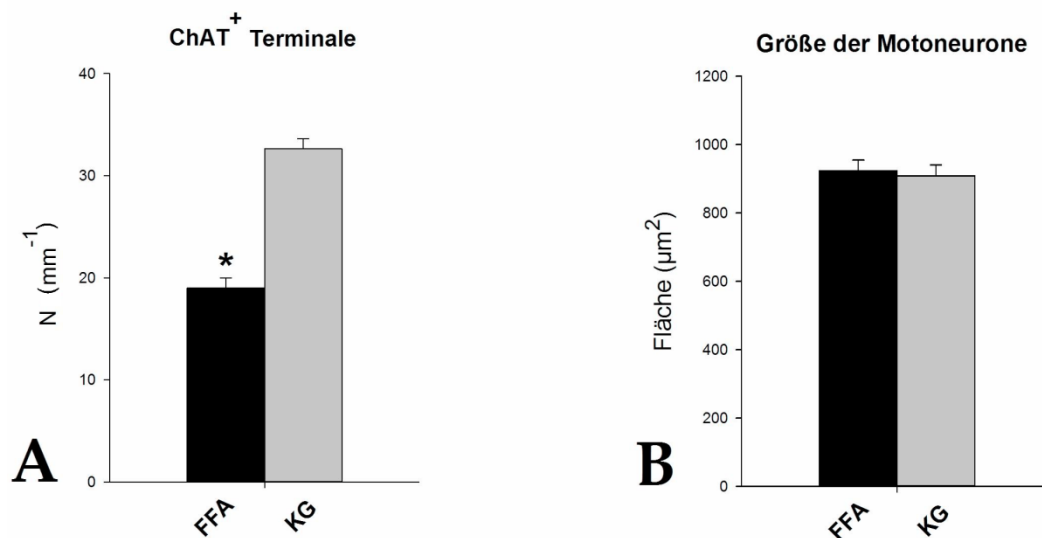


Abb.17 Analyse cholinergischer (ChAT^+), perisomatischer Axonterminale im Ncl. n. facialis. Die Dichte ChAT^+ Terminale (A) (Synapsenanzahl pro Perikaryonumfang der Motoneurone) und Größe der Motoneurone (B), welche durch stereologische Flächenbestimmung der Motoneuron-Perikarya des Ncl. n. facialis von Ratten der Kontrollgruppe (KG) und Ratten 4 Monate nach FFA ermittelt wurde. Es sind die Mittelwerte mit deren Standardfehlern (SEM) dargestellt. Das Sternchen markiert einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p < 0.05$).

4.4 Der Facialiskern atrophiert während der Nervenzellregeneration

Für die Beurteilung der Ergebnisse von Zell- und Synapsenanzahlen innerhalb des Facialiskerns war es notwendig dessen entsprechende Referenzvolumina in beiden Gruppen zu ermitteln. Deshalb wurde 4 Monate nach FFA bzw. Scheinoperation auf der rechten Seite zuerst das Volumen des ipsilateralen Facialiskerns bestimmt, wofür Nissl-gefärbte serielle Schnitte durch den Hirnstamm verwendet wurden (Abb. 5). Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Volumenminderung um -19% bei den Ratten 4 Monate nach FFA im Vergleich zu der scheinoperierten Kontrollgruppe (Abb. 18A). Somit konnte eine Progression in der Atrophie des Facialiskerns bestätigt werden, die im Prozess der Nervenregeneration schon im Verlauf 2 Monate nach Operation beobachtet wurde (Raslan et al. 2013).

Die Atrophie des Facialiskerns wurde dahingehend weiter exploriert, indem untersucht wurde ob die Volumenminderung des Kerngebiets mit einem Verlust von Motoneuronen oder deren Atrophie zu erklären war. Die Gesamtzahl der Motoneurone wurde durch Auszählung der Nissl-gefärbten Motoneuron-Perikarya in den ipsilateralen Facialiskernen der Ratten 4 Monate nach FFA und Scheinoperation bestimmt. Zwischen beiden Gruppen war kein signifikanter Unterschied festzustellen (5336 ± 160 bzw. 5466 ± 172 Neurone in der FFA- bzw. Kontrollgruppe, $p = 0.59$, t-Test, Abb. 18B). Dies bestätigt Beobachtungen anderer Arbeiten, in denen ebenfalls nach einer facio-facialen Anastomosen-Operation bei Ratten kein Verlust der Motoneuronenzahl im Facialiskern zu Verzeichnen war (Guntinas-Lichius et al. 1994, Chen et al. 2008). Für die Ermittlung einer eventuellen Atrophie der Motoneurone selbst wurde deren Größe über die Messung der Flächeninhalte der Perikarya in Nissl-gefärbten Präparaten bestimmt. Auch hier konnte, wie in Abschnitt 4.3 erwähnt, nachgewiesen werden, dass die Motoneurone in beiden Gruppen ähnliche Größen aufzeigten ($909 \pm 32 \mu\text{m}^2$ bzw. $924 \pm 31 \mu\text{m}^2$ in der FFA- bzw. der Kontrollgruppe, $p = 0.75$, t-Test, Abb. 17B). Somit zeigen die Ergebnisse, dass FFA zwar zu einer Atrophie des Facialiskerns führt, nicht aber zu einer gleichzeitigen Atrophie oder dem Verlust der Motoneurone.

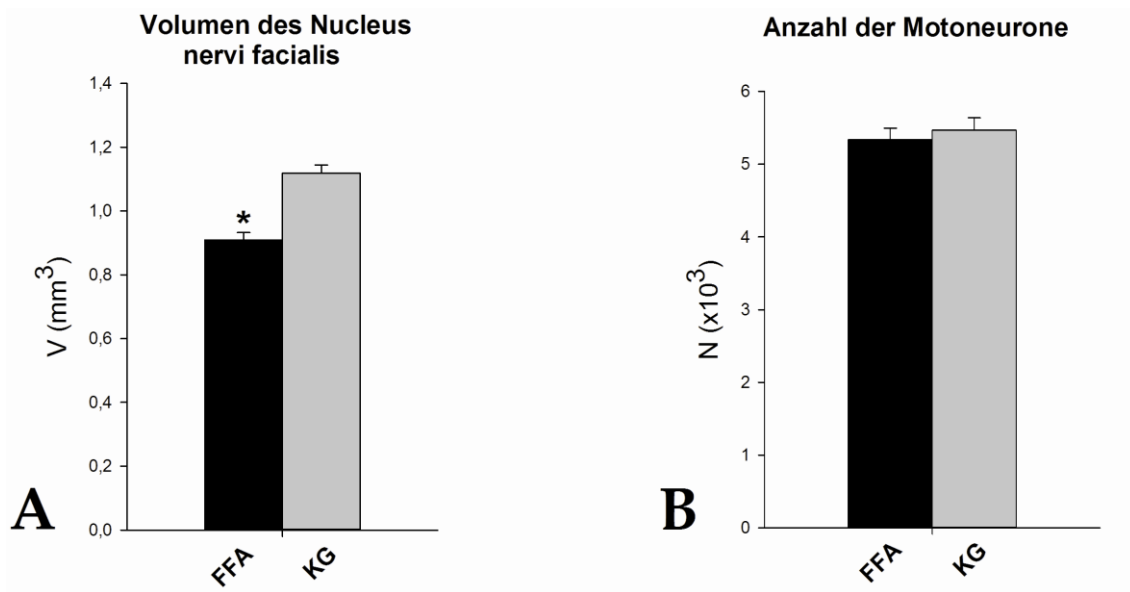


Abb.18 Volumetrische Analyse des Ncl. n. facialis (A) und Gesamtzahl der Motoneurone des Ncl. n. facialis (B). Dargestellt sind die Anzahl (N) der Motoneurone und das Volumen (V) des rechten Ncl. n. facialis der scheinputerierten Ratten der Kontrollgruppe (KG) und der Ratten 4 Monate nach FFA. Es sind die Mittelwerte und deren Standardfehler (SEM) abgebildet. Das Sternchen markiert einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p < 0.05$).

4.5 Reaktive Zunahme der Mikroglia im Facialiskern nach peripherer Axotomie des N. facialis

Die Analyse von Mikrogliazellen im Facialiskern erfolgte mittels immunfluoreszenzmarkierter Antikörper gegen Iba1 (Abb. 19), welches sowohl in ruhenden als auch aktivierten Mikrogliazellen vorkommt (Imai et al. 1996, Ito et al. 1998, Sasaki et al. 2001). Die Untersuchung offenbarte eine signifikante Zunahme der Iba1⁺ Zellen um +29% bei den Ratten 4 Monate nach FFA im Vergleich zu den scheinputerierten Kontrolltieren (Abb. 20). Diese Ergebnisse bestätigen eine weitere Persistenz der Mikrogliose im Facialiskern, welche in ihrer Ausprägung dem Niveau 2 Monate nach FFA (Raslan et al. 2013) entspricht.

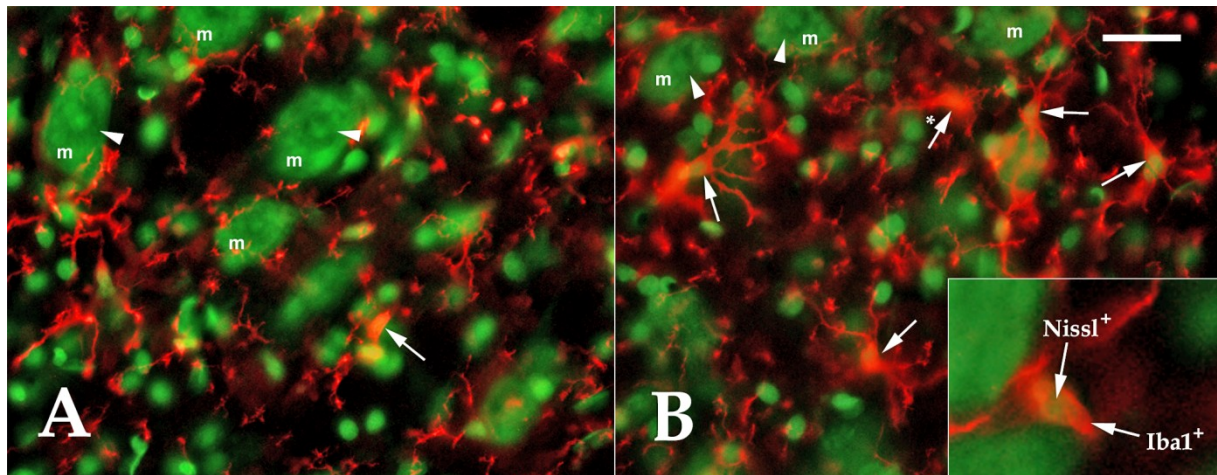


Abb.19 Darstellung von Mikrogliazellen. Die Abbildungen zeigen Ausschnitte des Ncl. n. facialis in einer Doppelfärbung mit Nissl und dem Mikrogliazellmarker Iba1. Abbildung A stammt von einer Ratte der Kontrollgruppe 4 Monate nach Scheinoperation (KG). Abbildung B zeigt den Zustand bei einer Ratte 4 Monate nach FFA. Als Mikrogliazelle (*Pfeile*) wurde die Zelle gewertet, bei der die Iba1 (rot) gefärbte zelluläre Struktur zusammen mit deren Nissl (grün) gefärbten Kern in Erscheinung trat (Lupenfenster in Abb. B). War innerhalb der Zelle kein Kern nachweisbar, wurde diese Zelle nicht gezählt (*Pfeil mit Sternchen*). Somata (*m*) und Nuclei (*Pfeilspitzen*) der Motoneurone. Weißer Balken = 25 µm.

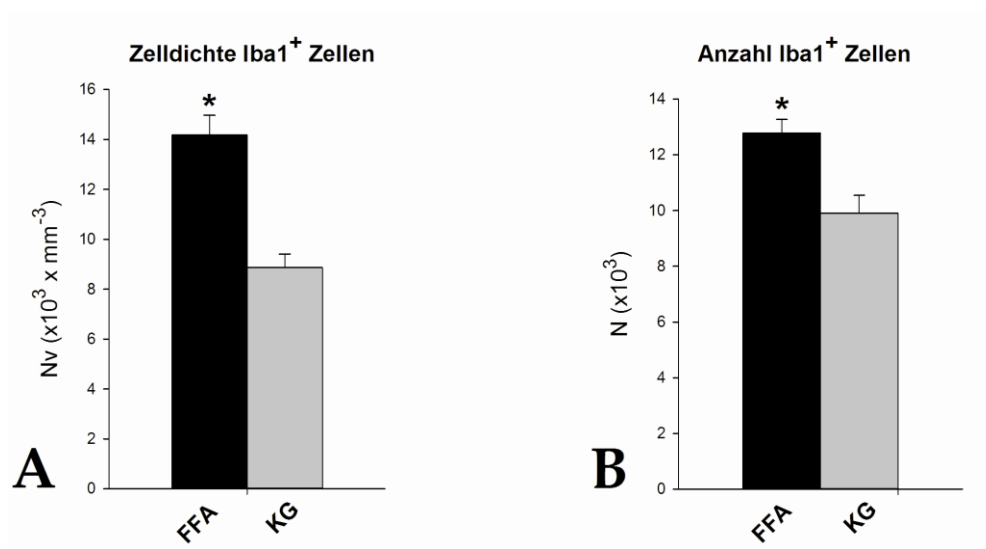


Abb.20 Analyse der Mikrogliazellen. Die numerische Dichte (Nv) und die Anzahl (N) Iba1⁺ Zellen innerhalb des Ncl. n. facialis sind in Abbildung A und B für scheinoperierte Ratten der Kontrollgruppe (KG) und für Ratten 4 Monate nach FFA aufgezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte mit deren Standardfehlern (SEM). Die Sternchen markieren signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen ($p < 0.05$).

4.6 Vermehrte Polyinnervation neuromuskulärer Endplatten

Ein wichtiger limitierender Faktor für eine korrekte Reinnervation der Gesichtsmuskulatur nach Durchtrennung und facio-facialer Reanastomosierung des Facialisnervs ist das Auftreten der terminalen Axonaussprossungen, wodurch es zu einer Polyinnervation einer neuromuskulären Endplatte durch mehrere Motoneurone kommt (Guntinas-Lichius und Angelov 2008) (Abb. 23A). Um das Ausmaß der Polyinnervation mit dem entsprechenden funktionellen Outcome korrelieren zu können, wurde den Ratten beider Gruppen, im Anschluss an Videoanalysen der Vibrissenbewegungen, der M. levator labii superioris ipsilateral zur operierten Seite präpariert und histologisch aufgearbeitet. Die Analyse von neuromuskulären Endplatten mit den korrespondierenden Axonterminalen erfolgte über eine Doppelfärbung mit α -Bungarotoxin und Antikörpern gegen Cholin-Acetyltransferase, ChAT. Die Untersuchungen zeigten bei Tieren 4 Monate nach FFA eine signifikante Abnahme der monoinnervierter Endplatten auf 56% und eine signifikante Zunahme der polyinnervierten Endplatten auf das 3,9-fache im Vergleich zum Innervationsstatus bei scheinoperierten Ratten der Kontrollgruppe (Abb. 21). Einen ebenfalls signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen mit einer Zunahme um das 5,7-fache bei Tieren nach Facialisläsion wiesen sogenannte „nicht-innervierte“ Endplatten auf. Diese wurden zwar mittels α -Bungarotoxin dargestellt, besaßen aber keine sie versorgenden motoneuronalen Axone.

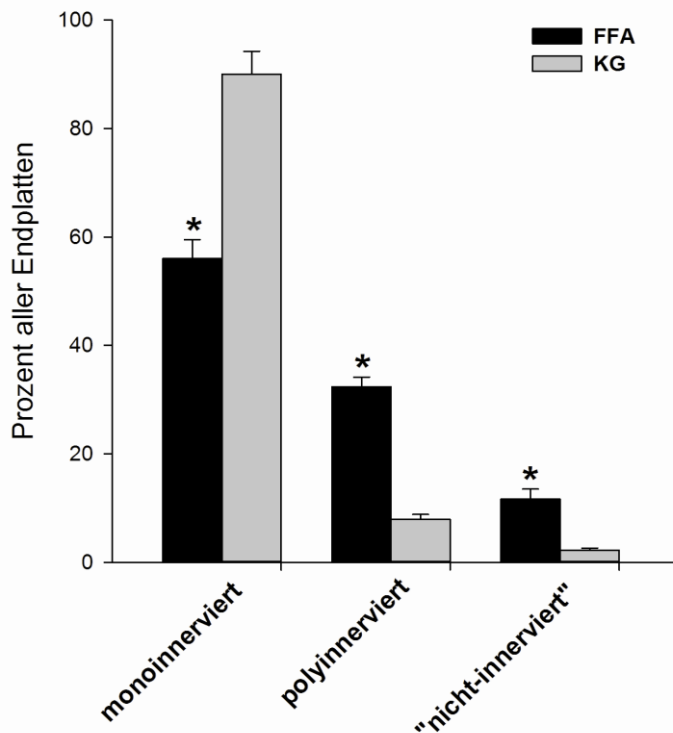


Abb.21 Analyse der Polyinnervation von Endplatten der Muskelfasern des rechten Musculus levator labii superior von scheinooperierten Ratten der Kontrollgruppe (KG) und Ratten 4 Monate nach stattgehabter FFA. Die durchschnittliche Anzahl ausgewerteter Endplatten pro Muskel betrug 288 ± 28 in der FFA- und 246 ± 41 in der KG-Gruppe. Dargestellt sind Mittelwerte mit deren Standardfehlern (SEM). Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen sind durch Sternchen markiert ($p < 0.05$).

4.7 Korrelationsanalysen zwischen funktionellen und strukturellen Parametern

Ist der durchtrennte Facialisnerv nach FFA funktionell regeneriert, so bewegt die Ratte sowohl auf der gesunden als auch auf der Anastomosenseite die Vibrissen in derselben Frequenz (Angelov et al. 2007). Demnach sind die Geschwindigkeit und Beschleunigung der Vibrissen proportional zur verminderten Amplitude auf der defekten Seite reduziert (Tomov et al. 2002, Angelov et al. 2005). Die lineare Korrelationsanalyse deckte signifikant mit der Amplitude einhergehende stereologisch erhobene Parameter innerhalb des Facialiskerns auf. Zu diesen gehören die Iba1⁺ Zellzahl, die VGLUT2⁺ und ChAT⁺ Terminale und die Relation exzitatorischer (VGLUT2⁺) zu inhibitorischer (VGAT⁺) Terminale (Abb. 22A-D). Weiterhin als signifikant erwies sich eine negative Korrelation zwischen dem Anteil polyinnervierter neuromuskulärer Endplatten der Muskelfasern der Mm. levatores labii superiores zwischen Ratten 4 Monate nach FFA und den Ratten der Kontrollgruppe 4 Monate nach Scheinoperation (Abb. 23B).

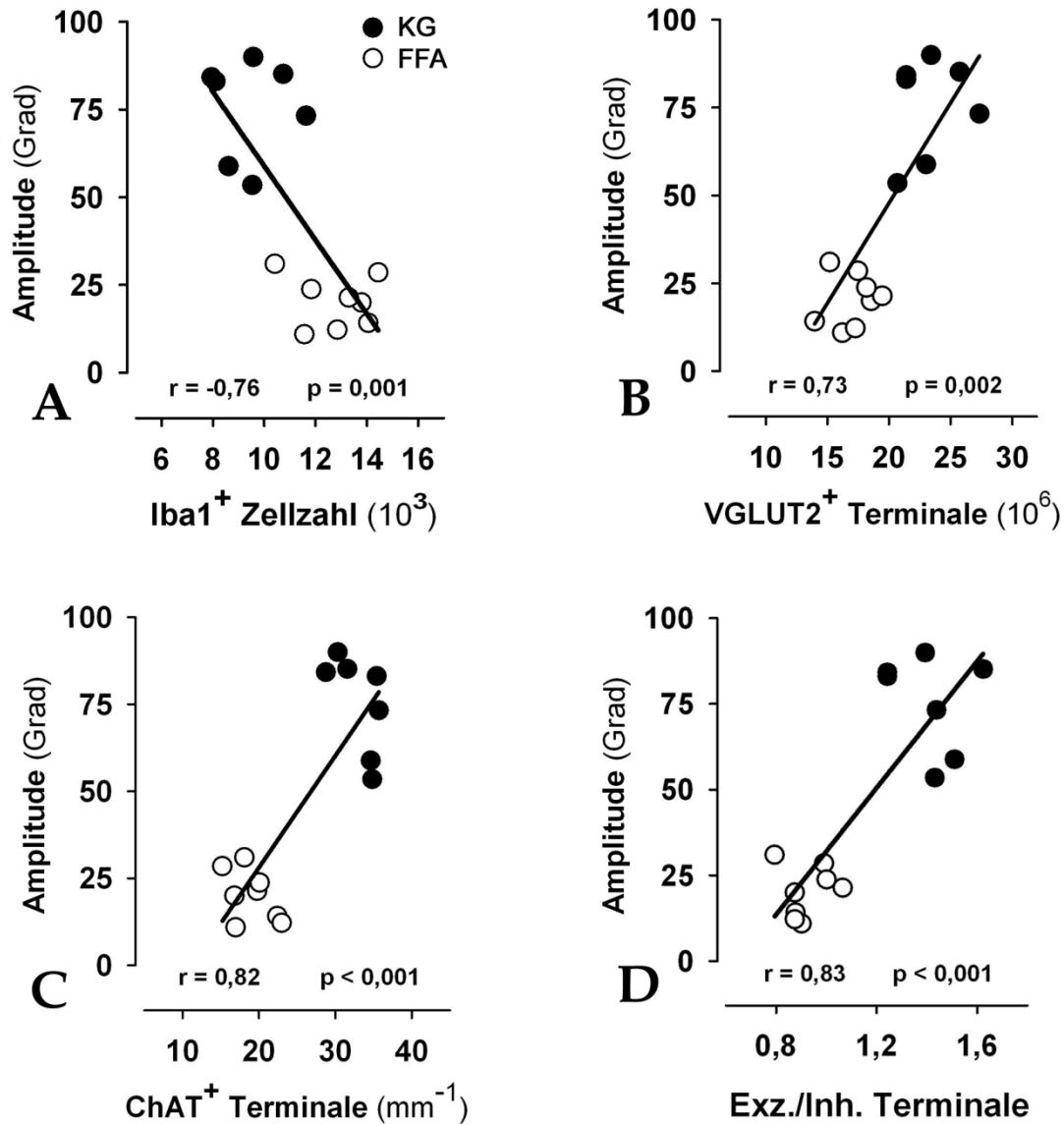


Abb.22 Korrelationen zwischen den individuell maximalen Amplituden der Vibrissenbewegungen und strukturellen Veränderungen im Facialiskern 4 Monate nach Operation der facio-facialen Anastomose („FFA“, *weiße Kreise*) und scheinoperierter Kontrollgruppe („KG“, *schwarze Kreise*). In den Abbildungen A bis D sind die Werte der Iba1⁺ Zellen, VGLUT2⁺ und ChAT⁺ Terminalen und die Exz./Inh.-Terminalen-Ratio (Verhältnis von VGLUT2⁺ zu VGAT⁺ Terminalen) mit den maximalen Amplituden der jeweiligen Tiere korreliert und in Streudiagrammen dargestellt. r - Korrelationskoeffizient und p - Irrtumswahrscheinlichkeit.

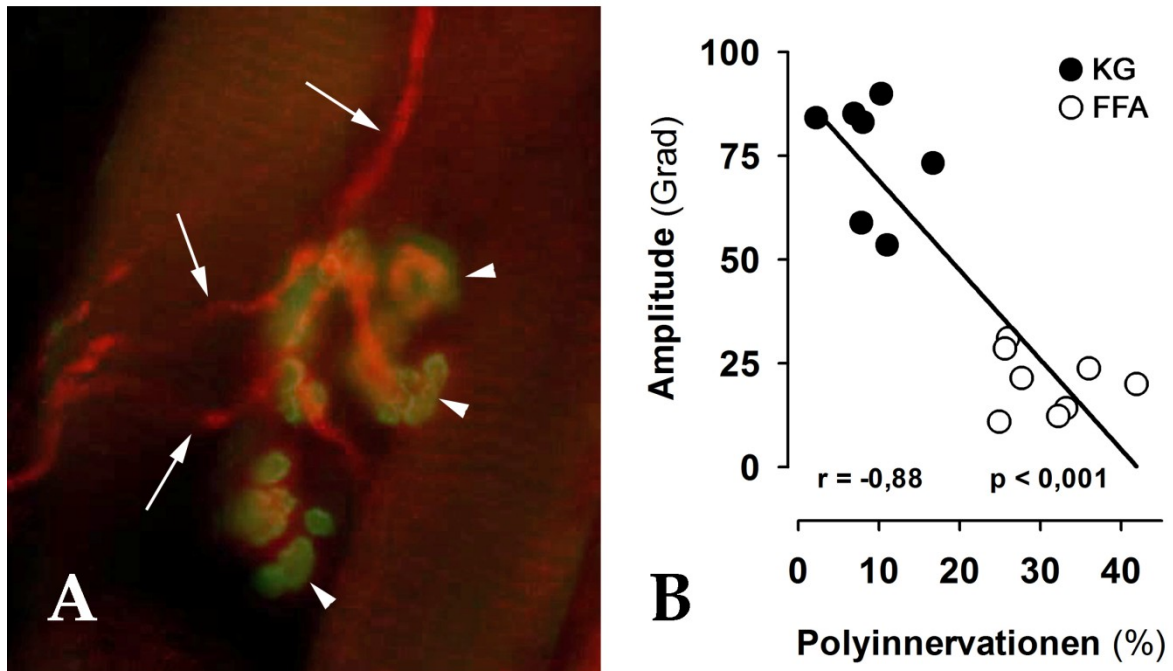


Abb.23 Korrelation zwischen den individuell maximalen Amplituden der Vibrissenbewegungen und dem Grad der Polyinnervation der Mm. levatores labii superiores bei Ratten 4 Monate nach FFA (*weiße Kreise* in Abb. B) und Scheinoperation (*schwarze Kreise* in Abb. B). Als „polyinnerviert“ wurden die α -Bungarotoxin-gefärbten Endplatten (*Pfeilköpfe* in Abb. A) gewertet, welche mehr als eine ChAT⁺ Terminale aufwiesen (*Pfeile* in Abb. A). In Abb. B sind die korrelierten Werte mit der resultierenden Regressionsgerade in einem Streudiagramm abgebildet. r - Korrelationskoeffizient und p - Irrtumswahrscheinlichkeit.

5. Diskussion

5.1 Progredienz inhibitorischer Terminale und Abnahme des exzitatorischen Inputs im regenerierenden Facialiskerngebiet

Die Untersuchung des afferenten Inputs des Facialiskerngebiets 4 Monate nach FFA zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe, dass eine Reduktion axonaler Terminale ($VGLUT2^+ + VGAT^+$) um -8% eingetreten war. Diese Reduktion ist zu einem früheren Zeitpunkt nach Läsion, nämlich 2 Monate nach FFA mit -20% noch deutlicher ausgeprägter (Raslan et al. 2013). Somit ist eine Regression des reduzierten afferenten Inputs zwischen 2 und 4 Monaten nach Läsion und Regeneration zu verzeichnen. Diese Deafferenzierung des Facialiskerngebiets kann zum einen durch das sogenannte synaptische Stripping nach erfolgter Axotomie erklärt werden (Graeber et al. 1993). Hierbei schieben sich mehrere Membranlagen von Astrozyten zwischen die Prä- und Postsynapsen und verhindern somit eine Überstimulation und die exzitotoxische Induktion der Apoptose (Graeber et al. 1993, Guntinas-Lichius und Angelov 2008, Jinno und Yamada 2011). Zum anderen beeinflusst das Verlorengelassen der Postsynapsen die Aktivität der exzitatorischen und inhibitorischen Neurone, wodurch eine Schrumpfung derer Axonterminalen eingeleitet wird (Lichtman und Colman 2000, Bishop et al. 2004, Vanderhaeghen und Cheng 2010).

Weiterhin zeigten die Ergebnisse, dass sich eine Verschiebung des Verhältnisses exzitatorischer ($VGLUT2^+$) zu inhibitorischer ($VGAT^+$) Terminale in Richtung der Inhibition ergab. Diese war im Vergleich zu einer Analyse, die 2 Monate nach FFA durchgeführt wurde (Raslan et al. 2013), noch deutlicher ausgeprägt. Die Veränderungen der Rezeptorexpression facialer Motoneurone nach peripherer Läsion sind inzwischen intensiv erforscht. Demnach ist von Seiten der exzitatorischen Neurotransmission bekannt, dass die Expression nikotinerger Acetylcholinrezeptoren vom Typ-2 nach Facialisläsion abnimmt (Senba et al. 1990) und NMDA-, AMPA- und metabotrope Glutamaterezeptoren ebenfalls herunter reguliert werden (Piehl et al. 1995, Anneser et al. 2000, Eleore et al. 2005). Die gefundene Reduktion $VGLUT2^+$ axonaler Terminalen im Facialiskern 4 Monate nach FFA kann demnach mit dem Verlust postsynaptischer Rezeptoren assoziiert sein (Vanderhaeghen und Cheng 2010) und führt im Verlauf zu keiner kompensatorischen Heraufregulierung motoneuronaler glutamaterger Postsynapsen (Eleore et al. 2005).

Für den inhibitorischen afferenten Input sind faciale Motoneurone mit zahlreichen GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren ausgestattet, welche durch GABAerge und glycinerge Prämotoneurone adressiert werden (Li et al. 1997). Nach peripherer Facialisläsion wurde gezeigt, dass es nach wenigen Tagen zu einer deutlichen Reduktion sowohl der GABA_A- als auch der GABA_B-Rezeptorexpression kommt, welche auch nach vollständiger Regeneration des Facialisnervs reduziert bleibt (Vassias et al. 2005). Über die Dynamik von Glycinrezeptoren der Motoneurone des Hypoglossuskerngebietes ist bisher bekannt, dass deren Expression nach peripherer Nervenläsion initial deutlich supprimiert wird, nach vollständiger Reinnervation des Zielmuskels jedoch wieder das Ausgangsniveau erreicht (Rotter et al. 1984). Die quantitative Analyse VGAT⁺ Terminalen im Facialiskern nach FFA zeigte im Vergleich zu Kontrolltieren nach 2 Monaten vorerst einer Reduktion (Raslan et al. 2013) und nach 4 Monaten eine deutliche Zunahme über das Ausgangsniveau hinaus. Die infolge der Facialisläsion nachweisbaren Veränderungen des Rezeptorbesatzes der Motoneurone, spiegelt eine retrograde Axonreaktion wieder, welche durch Umstellung der Genexpression die Neurogenese induzieren soll (Plunet et al. 2002, Zujovic et al. 2005). Die Ausstattung mit exzitatorischen und inhibitorischen Neurotransmitter-Rezeptoren der Motoneurone wird demnach maßgeblich durch deren funktionellen Zustand reguliert (Rotter et al. 1984). Korrelationsanalysen zeigten demnach einen starken positiven Zusammenhang zwischen dem Grad der funktionellen Restauration und dem Verhältnis zwischen exzitatorischen zu inhibitorischen Terminalen (Abb. 22BD). Die Dynamik der Quantität axonaler Terminalen im Facialiskern, welche 2 und 4 Monate nachbeobachtet wurde (Raslan et al. 2013), reflektiert somit Prozesse des afferenten Inputs, welche zum einen die Anpassung an den Regenerationsstatus und zum anderen die Wiederherstellung der funktionellen Aktivität der Motoneurone modulieren (Navarro et al. 2007).

5.2 Abnahme modulierender cholinergischer Synapsen an Motoneuronen und funktionelle Folgen

Es ist bekannt, dass ChAT⁺ C-Typ-Terminals, welche im Gegensatz zu Motoneuronkollaterals größer sind und ihre Synapsen überwiegend an den Somata und proximalen Dendriten ausbilden, mit postsynaptischen Muskarinrezeptoren vom Typ-2 assoziiert sind (Hellstrom et al. 2003). Außerdem wurde aufgeklärt, dass neben spinalen Motoneuronen auch solche des Facialis-, Trigeminus- und Hypoglossuskerngebietes präsynaptische C-Typ-Terminals aufweisen (Conradi 1969, Davidoff und Irintchev 1986). Der Ursprung dieser Zellen, welche die Motoneurone adressieren, ist aber immer noch unbekannt (Miles et al. 2007). Infolge der Erkenntnis, dass eine Woche nach einer axonalen Läsion die Anzahl von M2-Muskarinrezeptoren der Motoneurone auf die Hälfte abnimmt und nahezu keine M2-Muskarinrezeptor-mRNA innerhalb der Motoneurone mehr nachweisbar ist, wurde postuliert, dass Läsionen des Facialisnervs zu einer Hemmung der Transkription von M2-Muskarinrezeptor-Genen führt und dadurch die Expression von Muskarinrezeptor-Proteinen reduziert wird (Hoover et al. 1996). Mit diesen Daten übereinstimmend konnte sowohl 2 Monate als auch 4 Monate nach FFA (Raslan et al. 2013) ein mit der Abnahme der Rezeptoren einhergehender Verlust von ChAT⁺ C-Typ-Terminals nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Arbeit von Raslan wurde sogar eine weitere signifikante Abnahme dieser Terminals gefunden. Die Aktivierung der M2-Muskarinrezeptoren führt über eine Reduktion der Amplitude der Afterhyperpolarisation zu einer gesteigerten Erregbarkeit der Motoneurone mit Zunahme derer repetitiven Aktionspotentialfrequenz (Miles et al. 2007). Diese Modulation der Rhythmik, mit der Motoneurone feuern, gewährleistet eine angemessene und koordinierte Muskelkontraktion (Brezina et al. 2000). Folglich muss bei einem Verlust des cholinergen Inputs in dem Ausmaß der gezeigten Ergebnisse, mit einem Rückgang der ChAT⁺ Synapsendichte um -42% 4 Monate nach FFA im Vergleich zur Kontrollgruppe, mit einer insuffizient modulierten Erregbarkeit der Motoneurone und demnach eingeschränkter Effizienz der muskulären Kontraktionen gerechnet werden. Bestätigt wird diese Hypothese bei Gegenüberstellung des cholinergen Inputs der facialis Motoneurone mit dem korrespondierenden funktionellen Outcome der Vibrissenmotorik, indem sich eine strenge positive Korrelation zwischen beiden Parametern zeigte (Abb. 22C).

5.3 Atrophie des Facialiskerns und nukleäre Deafferenzierung

Gegenüber den scheinoperierten Kontrolltieren wurde bei den Ratten 4 Monate nach FFA eine signifikante Reduktion des facialis Kernvolumens gefunden (-19%). Diese Atrophie war, ebenso wie in vorherigen Arbeiten (Guntinas-Lichius et al. 1994), nicht mit einem motoneuronalen Defizit gegenüber den ipsilateralen Facialiskernen der Kontrolltiere assoziiert. Da zwischen beiden Gruppen ebenfalls kein Größenunterschied der Motoneuronsomata aufzudecken war, müssen weitere zytologische Rearrangements als Ursache für die Kernatrophie in Betracht gezogen werden. Eine potentielle Erklärung kann die Retraktion der motoneuronalen Dendritenbäume infolge einer Axotomie liefern (Brannstrom et al. 1992b). Nachdem eine Reinnervation der Muskulatur stattgefunden hat, kommt es jedoch wieder zur vollständigen Rekonstruktion der Dendritenbäume (Brannstrom et al. 1992b). Lediglich die Membranfläche und der Durchmesser der proximalen Dendritenstämme bleibt bis zu einem Zeitpunkt von 12 Wochen nach Axotomie reduziert und weist erst nach 2 Jahren wieder die ursprüngliche Morphologie auf (Brannstrom et al. 1992b, Brannstrom et al. 1992a). Stereologische Analysen von zerebellären Kerngebieten lieferten einen Einblick in den zytoarchitektonischen Aufbau und das verhältnismäßige Vorkommen verschiedener zellulärer Bestandteile (Heckroth 1994). Demnach machen neuronale Somata und Dendriten nur 19% des gesamten Kernvolumens aus. Axone, axosomatische und axodendritische synaptische Terminale nehmen hingegen fast 50% des Kernvolumens ein (Heckroth 1994). Vier Monate nach FFA betrug der gemittelte Verlust des Facialiskernvolumens im Vergleich zur Kontrollgruppe 0.21 mm^3 ($0.91 \pm 0.02 \text{ mm}^3$ gegenüber $1.12 \pm 0.03 \text{ mm}^3$). Das gemittelte Defizit axonaler Terminale zwischen beiden Gruppen betrug 3.03×10^6 Terminale (VGLUT2⁺ + VGAT⁺ in FFA und KG, $35.55 \pm 1.2 \times 10^6$ gegenüber $38.59 \pm 1.88 \times 10^6$). Eine nukleäre Deafferenzierung, und somit der Verlust des Hauptvolumenanteils eines Kernareals (Heckroth 1994), könnte somit einen Großteil der beobachteten Kernatrophie erklären, da die Elimination von Synapsen oft eine Reduktion axonaler Terminalen nach sich zieht (Vanderhaeghen und Cheng 2010).

5.4 Persistierende Mikrogliose während der Facialiskernregeneration

Mikrogliazellen stammen von der hämatopoietischen Stammzelle ab und wandern während der pränatalen Entwicklung bis wenige Wochen postnatal in das zentrale Nervensystem ein, wo sie ubiquitär in ruhendem Zustand vorhanden sind (Dalmau et al. 1998, Kaur et al. 2001). Zu einer Aktivierung dieser Zellen kommt es typischerweise bei Infektionen und Entzündungen aber auch bei Traumata, Ischämien, Hirntumoren und neurodegenerativen Prozessen (Kreutzberg 1996). Dabei kommt es zur Proliferation und chemotaktisch gezielter amöboider Migration der aktivierten Mikrogliazellen (Kim und de Vellis 2005). Neben der Abwehrfunktion durch Phagozytose und Antigenpräsentation können Mikrogliazellen auch durch Sekretion proinflammatorischer Zytokine, Superoxidanionen und NO neurotoxisches Potential entfalten (Nakajima und Kohsaka 2001). Allem voran zeigten Arbeiten, dass TNF α eine Reduktion von Motoneuronen und Oligodendrozyten durch Apoptoseinduktion bewirken kann (Probert et al. 1995, Nakajima und Kohsaka 2001, He et al. 2002). Auf der anderen Seite unterstützen Mikrogliazellen die neuronale Reorganisation, indem sie neurotrophische Faktoren wie NGF, NT-3 und BDNF sezernieren und fungieren demnach auch neuroprotektiv (Nakajima et al. 2001, Li et al. 2007). Die immunologische Kontrolle von Gehirn und Rückenmark ist primär durch Mikroglia und perivaskuläre Zellen gegeben, da die Blut-Hirn-Schranke unter normalen Bedingungen keinen Übertritt von Leukozyten aus dem Blut ins ZNS gewährleistet (Hickey und Kimura 1988, Graeber und Streit 1990). Eine Aktivierung der Mikroglia in Kerngebieten von Hirnstamm und Rückenmark ist neben den oben genannten Ursachen allerdings auch bei einer peripheren neuronalen Verletzung, wie einer Axotomie, zu beobachten (Barron et al. 1990, Kreutzberg 1996). Beschädigte Neurone geben als Zeichen ihrer Inkonsistenz Kalium, ATP, Zytokine und 4-Hydroxynonenal an den Extrazellularraum ab und führen dadurch zur Aktivierung der Mikroglia (Bruce-Keller 1999). Unmittelbar nach akuter Nervenschädigung setzt eine enorme Proliferation der aktivierten Mikroglia-Zellen ein, welche sich direkt um die geschädigten Neurone gruppieren, um den synaptischen Input dieser zu verdrängen und durch Phagozytose das extrazelluläre Milieu zu sanieren (Jones et al. 1997). Durch Untersuchungen des mRNA-Expressionsprofils im Rückenmark- und Facialiskerngebiet nach peripherer Axotomie konnte beobachtet werden, dass es im Rückenmark innerhalb von 24 Stunden zu

einem starken Anstieg der IL-1 β - und TNF- α -Produktion kam, wohingegen diese im Facialiskern erst nach einer Woche ihr Maximum erreichte (Streit et al. 1998). Weitere experimentelle Arbeiten zeigten zudem, dass die spinale IL-1 β - und TNF- α -Produktion auf aktivierte Mikroglia zurückzuführen ist (Bartholdi und Schwab 1997). Typischerweise dient die Sekretion dieser beiden Zytokine zur Einwanderung von Neutrophilen in geschädigtes Gewebe (Wankowicz et al. 1988). Jedoch wurde gezeigt, dass es den Neutrophilen nicht möglich ist in das unbeschädigte ZNS einzudringen (Andersson et al. 1992). Demnach nehmen primär andere Faktoren Einfluss auf das Kerngebiet, welche ebenfalls durch Mikroglia-produziertes IL-1 β und TNF- α induziert werden. Dazu gehört, neben der IL-6-Bildung (Sawada et al. 1992), die Expression neurotrophischer Faktoren in Astrozyten (Spranger et al. 1990). Im Anschluss an die Wiederherstellung des Defektes gehen die überzähligen aktivierten Mikroglia-Zellen über programmierten Zelltod zugrunde (Jones et al. 1997).

Untersuchungen, welche die Quantität der Mikroglia im Facialiskern 2 und 4 Monate nach FFA nachbeobachteten (Raslan et al. 2013), wiesen eine anhaltende Überzahl an Mikroglia nach. Eine mögliche Erklärung hierfür ergibt sich aus einer weiteren wichtigen Funktion aktivierter Mikroglia. Einige Wochen nach Axotomie kann eine Neosynaptogenese in Form einer Veränderung in Dichte und Art der Postsynapsen an Motoneuronsomata beobachtet werden (s. 5.1). Es ist ferner bekannt, dass aktivierte Mikroglia genauso wie reaktive Astrozyten die Fähigkeit besitzen Thrombospondine zu exprimieren (Chamak et al. 1995). Dies sind extrazelluläre Matrixproteine, welche über Zell-Zell und Zell-Matrix-Interaktion die Ausbildung von Synapsen induzieren (Christopherson et al. 2005). Da die Axotomie nachweislich eine Sekretion von Thrombospondinen aus Mikroglia bewirkt (Chamak et al. 1995), kann vermutet werden, dass die Dynamik postsynaptischer Elemente und präsynaptischer Afferenzen im Facialiskern auch nach einem Zeitraum von 4 Monaten nach Facialisläsion mit einer anhaltenden Induktion der Neosynaptogenese durch Mikroglia assoziiert ist (Bessis et al. 2007, Graeber und Streit 2010).

5.5 Polyneurone Innervation neuromuskulärer Endplatten als limitierender Faktor für die funktionelle Wiederherstellung

Die Entwicklung der neuromuskulären Endplatten erfolgt initial über eine breit angelegte polyneurone Innervation der Muskelfasern, die im Verlauf zu monoinnervierten Endplatten heranreifen (Brown et al. 1976, Lichtman und Colman 2000, Sanes und Lichtman 2001). Die Rückbildung einst ausgesprossener Terminale erfolgt über einen retrograden Transport sogenannter Axosomata, welche eine Ansammlung vesikulärer Einschlüsse synaptischer Zellorganellen enthalten und diese bei ihrer Ankunft im Facialiskern an umgebende Gliazellen abgegeben (Bishop et al. 2004, Vanderhaeghen und Cheng 2010). Eine mögliche Ursache für eine schlechte funktionelle Wiederherstellung der Vibrissenmotorik nach einer Nervenläsion ist die ungerichtete kollaterale Aussprossung mehrerer Tochteraxone aus dem proximalen Nervenstumpf (Guntinas-Lichius et al. 2005, Guntinas-Lichius und Angelov 2008). Es ist aber mittlerweile bekannt, dass die experimentelle Reduktion der kollateralen Aussprossung durch Inhibierung neurotrophischer Faktoren nicht mit einer funktionellen Wiederherstellung der Vibrissenmotorik korreliert (Tomov et al. 2002, Guntinas-Lichius et al. 2005). Ein potentieller Grund ist das gleichzeitige Vorliegen einer posttransektionalen polyneuronalen Innervation der neuromuskulären Endplatten (Bratzlavsky und vander Eecken 1977, Angelov et al. 1999, Guntinas-Lichius et al. 2005). Bei diesem Phänomen können mehrere sich regenerierende aussprossende Axone dieselbe neuromuskuläre Endplatte einer Muskelfaser erreichen, was einen unphysiologischen Input durch unterschiedlich frequentiell schießende Motoneurone darstellt (Brown et al. 1981, Rich und Lichtman 1989, Ito und Kudo 1994). Allerdings können im Gegenzug auch mehrere neuromuskuläre Endplatten verschiedener Muskelfasern seriell von einer axonalen Terminale kontaktiert werden und dadurch ebenfalls eine anormale Reinnervation verursacht werden (Rich und Lichtman 1989, Son et al. 1996). Der Anteil an Endplatten an den Muskelfasern des ipsilateralen M. levator labii superioris, bei denen entweder eine Polyinnervation oder der Ein- und Ausgang einer seriell innervierenden axonalen Terminale vorlag, betrug in der Gruppe 4 Monate nach Läsion des Facialisnervs $32 \pm 2\%$, hingegen im mutmaßlich physiologischen Zustand bei Ratten 4 Monate nach der Scheinoperation nur $8 \pm 2\%$. Die Korrelation zwischen diesen Ergebnissen und den korrespondierenden Amplituden der Vibrissenanalysen

stellt einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Grad der Polyinnervation neuromuskulärer Endplatten und dem funktionellen Outcome dar. Diese Erkenntnis bestätigt die Vermutungen, dass es sich bei dem Phänomen der terminalen Aussprossung axonaler Terminalen um einen wichtigen limitierenden Faktor für die suffiziente Rückgewinnung der motorischen Funktion handelt.

6. Schlussfolgerungen

Auch 4 Monate nach Facialisläsion und Facialisregeneration ist innerhalb des Facialiskerngebiets eine Mikrogliose zu beobachten. Möglicherweise ist dieser anhaltende Zustand nicht mehr Ausdruck der Isolation und des Schutzes der Motoneurone vor der Exzitotoxizität durch die anhaltende afferente Stimulation, sondern vielmehr der indirekten Rekrutierung des afferenten Inputs durch Modulierung der Neosynaptogenese mit motoneuronalen Dendriten und Somata. Vereinbarend damit kann die beobachtete Zunahme der afferenten Terminalen nach 4 Monaten im Vergleich zu 2 Monaten nach FFA angesehen werden, welche in ihrer Summe allerdings zu beiden Zeitpunkten noch unterhalb des Ausgangsniveaus lagen. Lediglich die inhibitorischen (VGAT⁺) Terminalen, bei denen anfänglich eine Reduktion auftrat, nahmen im Verlauf der Regeneration bis 4 Monate nach Facialisläsion zu und befanden sich dann sogar oberhalb des Ausgangsniveaus. Warum eine derartige Verschiebung in Richtung der inhibitorischen Afferenzen entsteht ist bisher unklar und muss Thema nachfolgenden Arbeiten sein. Weiterhin konnte exploriert werden, dass die perisomatische, cholinerge Synapsendichte während der Langzeitbeobachtungen 2 und 4 Monate nach Facialisläsion eine progrediente Abnahme erfuhr. Möglicherweise führt dies zur stetig abnehmenden Modulierung der Erregbarkeit der Motoneurone und wirkt einer suffizienten Wiederherstellung der motorischen Funktion entgegen.

Anhand der Videoanalysen und biometrischen Berechnungen der Vibrissenbewegungen wurde deutlich, dass sich 4 Monate nach einer Durchtrennung des Facialisnervs mit anschließender Anastomosierung der Nervenstümpfe die motorische Funktion nur schlecht erholt. Hypothetisch wurde angenommen, dass pathologische Fehlinnervationen im Rahmen der terminalen Aussprossung einen maßgeblichen Anteil dazu beitragen. Diese Hypothese konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, da zum einen 4 Monate nach peripherer Facialisläsion ein signifikanter Mehranteil der neuromuskulärer Endplatten reinnervierter Muskelfasern Polyinnervationen aufwies und sich zum anderen eine starke negative Korrelation zwischen der Vibrissenbeweglichkeit und dem Level polyinnervierter Endplatten ergab.

7. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Adegbite AB, Khan MI, Tan L. 1991. Predicting recovery of facial nerve function following injury from a basilar skull fracture. *J Neurosurg*, 75 (5):759-762.
- Aldskogius H. 2011. Mechanisms and consequences of microglial responses to peripheral axotomy. *Front Biosci (Schol Ed)*, 3:857-868.
- Andersson PB, Perry VH, Gordon S. 1992. Intracerebral injection of proinflammatory cytokines or leukocyte chemotaxins induces minimal myelomonocytic cell recruitment to the parenchyma of the central nervous system. *J Exp Med*, 176 (1):255-259.
- Angelov DN, Guntinas-Lichius O, Wewetzer K, Neiss WF, Streppel M. 2005. Axonal branching and recovery of coordinated muscle activity after transection of the facial nerve in adult rats. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 180:1-130.
- Angelov DN, Skouras E, Guntinas-Lichius O, Streppel M, Popratiloff A, Walther M, Klein J, Stennert E, Neiss WF. 1999. Contralateral trigeminal nerve lesion reduces polyneuronal muscle innervation after facial nerve repair in rats. *Eur J Neurosci*, 11 (4):1369-1378.
- Angelov DN, Ceynowa M, Guntinas-Lichius O, Streppel M, Grosheva M, Kiryakova SI, Skouras E, Maegle M, Irintchev A, Neiss WF, Sinis N, Alvanou A, Dunlop SA. 2007. Mechanical stimulation of paralyzed vibrissal muscles following facial nerve injury in adult rat promotes full recovery of whisking. *Neurobiol Dis*, 26 (1):229-242.
- Anneser JM, Berthele A, Borasio GD, Castro-Lopes JM, Zieglgansberger W, Tolle TR. 2000. Axotomy of the sciatic nerve differentially affects expression of metabotropic glutamate receptor mRNA in adult rat motoneurons. *Brain Res*, 868 (2):215-221.
- Apostolova I, Irintchev A, Schachner M. 2006. Tenascin-R restricts posttraumatic remodeling of motoneuron innervation and functional recovery after spinal cord injury in adult mice. *J Neurosci*, 26 (30):7849-7859.
- Barron KD, Marciano FF, Amundson R, Mankes R. 1990. Perineuronal glial responses after axotomy of central and peripheral axons. A comparison. *Brain Res*, 523 (2):219-229.
- Bartholdi D, Schwab ME. 1997. Expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse: an in situ hybridization study. *Eur J Neurosci*, 9 (7):1422-1438.
- Bendella H, Pavlov SP, Grosheva M, Irintchev A, Angelova SK, Merkel D, Sinis N, Kaidoglou K, Skouras E, Dunlop SA, Angelov DN. 2011. Non-invasive stimulation of the vibrissal pad improves recovery of whisking function after simultaneous lesion of the facial and infraorbital nerves in rats. *Exp Brain Res*, 212 (1):65-79.
- Bessis A, Bechade C, Bernard D, Roumier A. 2007. Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia*, 55 (3):233-238.
- Bianchi B, Ferri A, Sesenna E. 2012. Facial reanimation after nerve sacrifice in the treatment of head and neck cancer. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 20 (2):114-119.
- Bishop DL, Misgeld T, Walsh MK, Gan WB, Lichtman JW. 2004. Axon branch removal at developing synapses by axosome shedding. *Neuron*, 44 (4):651-661.
- Blumcke S, Niedorf HR. 1966. Electron microscope studies of Schwann cells during the Wallerian degeneration with special reference to the cytoplasmic filaments. *Acta Neuropathol*, 6 (1):46-60.
- Bogorad FA. 1979. The symptom of crocodile tears. F. A. Bogorad. Introduction and translation by Austin Seckers. *J Hist Med Allied Sci*, 34 (1):74-79.
- Bosco A, Steele MR, Vetter ML. 2011. Early microglia activation in a mouse model of chronic glaucoma. *J Comp Neurol*, 519 (4):599-620.
- Brannstrom T, Havton L, Kellerth JO. 1992a. Restorative effects of reinnervation on the size and dendritic arborization patterns of axotomized cat spinal alpha-motoneurons. *J Comp Neurol*, 318 (4):452-461.

- Brannstrom T, Havton L, Kellerth JO. 1992b. Changes in size and dendritic arborization patterns of adult cat spinal alpha-motoneurons following permanent axotomy. *J Comp Neurol*, 318 (4):439-451.
- Bratzlavsky M, vander Eecken H. 1977. Altered synaptic organization in facial nucleus following facial nerve regeneration: an electrophysiological study in man. *Ann Neurol*, 2 (1):71-73.
- Brezina V, Orekhova IV, Weiss KR. 2000. The neuromuscular transform: the dynamic, nonlinear link between motor neuron firing patterns and muscle contraction in rhythmic behaviors. *J Neurophysiol*, 83 (1):207-231.
- Brown MC, Jansen JK, Van Essen D. 1976. Polyneuronal innervation of skeletal muscle in new-born rats and its elimination during maturation. *J Physiol*, 261 (2):387-422.
- Brown MC, Holland RL, Hopkins WG, Keynes RJ. 1981. An assessment of the spread of the signal for terminal sprouting within and between muscles. *Brain Res*, 210 (1-2):145-151.
- Bruce-Keller AJ. 1999. Microglial-neuronal interactions in synaptic damage and recovery. *J Neurosci Res*, 58 (1):191-201.
- Brushart TM, Seiler WAt. 1987. Selective reinnervation of distal motor stumps by peripheral motor axons. *Exp Neurol*, 97 (2):289-300.
- Bulloch K, Miller MM, Gal-Toth J, Milner TA, Gottfried-Blackmore A, Waters EM, Kaunzner UW, Liu K, Lindquist R, Nussenzweig MC, Steinman RM, McEwen BS. 2008. CD11c/EYFP transgene illuminates a discrete network of dendritic cells within the embryonic, neonatal, adult, and injured mouse brain. *J Comp Neurol*, 508 (5):687-710.
- Burt NS, Mc NA, Rossiter RJ. 1950. Chemical studies of peripheral nerve during Wallerian degeneration; lipids after nerve crush (axonotmesis). *Biochem J*, 47 (3):318-323.
- Cabrera B, Portillo F, Pasaro R, Delgado-Garcia JM. 1988. Location of motoneurons and internuclear neurons within the rat abducens nucleus by means of horseradish peroxidase and fluorescent double labeling. *Neurosci Lett*, 87 (1-2):1-6.
- Chamak B, Dobberty A, Mallat M. 1995. Immunohistochemical detection of thrombospondin in microglia in the developing rat brain. *Neuroscience*, 69 (1):177-187.
- Chaudhry FA, Reimer RJ, Bellocchio EE, Danbolt NC, Osen KK, Edwards RH, Storm-Mathisen J. 1998. The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *J Neurosci*, 18 (23):9733-9750.
- Chen J, Joon Lee H, Jakovcevski I, Shah R, Bhagat N, Loers G, Liu HY, Meiners S, Taschenberger G, Kugler S, Irintchev A, Schachner M. 2010. The extracellular matrix glycoprotein tenascin-C is beneficial for spinal cord regeneration. *Mol Ther*, 18 (10):1769-1777.
- Chen P, Song J, Luo L, Gong S. 2008. Plastic changes of synapses and excitatory neurotransmitter receptors in facial nucleus following facial-facial anastomosis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 28 (6):714-718.
- Choi D, Raisman G. 2002. Somatotopic organization of the facial nucleus is disrupted after lesioning and regeneration of the facial nerve: the histological representation of synkinesis. *Neurosurgery*, 50 (2):355-362; discussion 362-353.
- Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mullen CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Mosher DF, Bornstein P, Barres BA. 2005. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell*, 120 (3):421-433.
- Coleman MP, Conforti L, Buckmaster EA, Tarlton A, Ewing RM, Brown MC, Lyon MF, Perry VH. 1998. An 85-kb tandem triplication in the slow Wallerian degeneration (Wlds) mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (17):9985-9990.
- Conradi S. 1969. Ultrastructure and distribution of neuronal and glial elements on the surface of the proximal part of a motoneuron dendrite, as analyzed by serial sections. *Acta Physiol Scand Suppl*, 332:49-64.
- Cullheim S, Kellerth JO, Conradi S. 1977. Evidence for direct synaptic interconnections between cat spinal alpha-motoneurons via the recurrent axon collaterals: a morphological study using intracellular injection of horseradish peroxidase. *Brain Res*, 132 (1):1-10.

- Dalmau I, Finsen B, Zimmer J, Gonzalez B, Castellano B. 1998. Development of microglia in the postnatal rat hippocampus. *Hippocampus*, 8 (5):458-474.
- Davidoff MS, Irintchev AP. 1986. Acetylcholinesterase activity and type C synapses in the hypoglossal, facial and spinal-cord motor nuclei of rats. An electron-microscope study. *Histochemistry*, 84 (4-6):515-524.
- Dawidowsky K, Branica S, Batelja L, Dawidowsky B, Kovac-Bilic L, Simunic-Veselic A. 2011. Anatomical study of the facial nerve canal in comparison to the site of the lesion in Bell's palsy. *Coll Antropol*, 35 (1):61-65.
- Eleore L, Vassias I, Vidal PP, de Waele C. 2005. Modulation of the glutamatergic receptors (AMPA and NMDA) and of glutamate vesicular transporter 2 in the rat facial nucleus after axotomy. *Neuroscience*, 136 (1):147-160.
- Fanardjian VV, Kasabyan SA, Manvelyan LR. 1983. Mechanisms regulating the activity of facial nucleus motoneurons--2. Synaptic activation from the caudal trigeminal nucleus. *Neuroscience*, 9 (4):823-835.
- Friede RL, Bischhausen R. 1980. The fine structure of stumps of transected nerve fibers in subserial sections. *J Neurol Sci*, 44 (2-3):181-203.
- Graeber MB, Streit WJ. 1990. Microglia: immune network in the CNS. *Brain Pathol*, 1 (1):2-5.
- Graeber MB, Streit WJ. 2010. Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 119 (1):89-105.
- Graeber MB, Bise K, Mehraein P. 1993. Synaptic stripping in the human facial nucleus. *Acta Neuropathol*, 86 (2):179-181.
- Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ. 1988. The New Stereological Tools - Disector, Fractionator, Nucleator and Point Sampled Intercepts and Their Use in Pathological Research and Diagnosis. *APMIS*, 96 (10):857-881.
- Guntinas-Lichius O, Angelov DN. 2008. [Experimental studies for the improvement of facial nerve regeneration]. *HNO*, 56 (2):122-130.
- Guntinas-Lichius O, Streppel M, Stennert E. 2006. Postoperative functional evaluation of different reanimation techniques for facial nerve repair. *Am J Surg*, 191 (1):61-67.
- Guntinas-Lichius O, Neiss WF, Gunkel A, Stennert E. 1994. Differences in glial, synaptic and motoneuron responses in the facial nucleus of the rat brainstem following facial nerve resection and nerve suture reanastomosis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 251 (7):410-417.
- Guntinas-Lichius O, Streppel M, Angelov DN, Stennert E, Neiss WF. 1997. Effect of delayed facial-facial nerve suture on facial nerve regeneration. A horseradish peroxidase tracing study in the rat. *Acta Otolaryngol*, 117 (5):670-674.
- Guntinas-Lichius O, Effenberger K, Angelov DN, Klein J, Streppel M, Stennert E, Neiss WF. 2000. Delayed rat facial nerve repair leads to accelerated and enhanced muscle reinnervation with reduced collateral axonal sprouting during a definite denervation period using a cross-anastomosis paradigm. *Exp Neurol*, 162 (1):98-111.
- Guntinas-Lichius O, Irintchev A, Streppel M, Lenzen M, Grosheva M, Wewetzer K, Neiss WF, Angelov DN. 2005. Factors limiting motor recovery after facial nerve transection in the rat: combined structural and functional analyses. *Eur J Neurosci*, 21 (2):391-402.
- He BP, Wen W, Strong MJ. 2002. Activated microglia (BV-2) facilitation of TNF-alpha-mediated motor neuron death in vitro. *J Neuroimmunol*, 128 (1-2):31-38.
- Heckroth JA. 1994. A quantitative morphological analysis of the cerebellar nuclei in normal and lurcher mutant mice. II. Volumetric changes in cytological components. *J Comp Neurol*, 343 (1):183-192.
- Hedreen JC. 1998. Lost caps in histological counting methods. *Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 250 (3):366-372.
- Hellstrom J, Oliveira AL, Meister B, Cullheim S. 2003. Large cholinergic nerve terminals on subsets of motoneurons and their relation to muscarinic receptor type 2. *J Comp Neurol*, 460 (4):476-486.

- Hickey WF, Kimura H. 1988. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science*, 239 (4837):290-292.
- Hoover DB, Hancock JC. 1985. Effect of facial nerve transection on acetylcholinesterase, choline acetyltransferase and [3H]quinuclidinyl benzilate binding in rat facial nuclei. *Neuroscience*, 15 (2):481-487.
- Hoover DB, Baisden RH, Lewis JV. 1996. Axotomy-induced loss of m2 muscarinic receptor mRNA in the rat facial motor nucleus precedes a decrease in concentration of muscarinic receptors. *Histochem J*, 28 (11):771-778.
- Howard CV, Reed M.G. 1998. *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*. Springer-Verlag, New York.
- Imai Y, Iбата I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S. 1996. A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun*, 224 (3):855-862.
- Irintchev A, Rollenhagen A, Troncoso E, Kiss JZ, Schachner M. 2005. Structural and functional aberrations in the cerebral cortex of tenascin-C deficient mice. *Cereb Cortex*, 15 (7):950-962.
- Iseli TA, Harris G, Dean NR, Iseli CE, Rosenthal EL. 2010. Outcomes of static and dynamic facial nerve repair in head and neck cancer. *Laryngoscope*, 120 (3):478-483.
- Issa AN, Zhan WZ, Sieck GC, Mantilla CB. 2010. Neuregulin-1 at synapses on phrenic motoneurons. *J Comp Neurol*, 518 (20):4213-4225.
- Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. 1998. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, *Iba1*. *Brain Res Mol Brain Res*, 57 (1):1-9.
- Ito M, Kudo M. 1994. Reinnervation by axon collaterals from single facial motoneurons to multiple muscle targets following axotomy in the adult guinea pig. *Acta Anat (Basel)*, 151 (2):124-130.
- Iwata N, Kitai ST, Olson S. 1972. Afferent component of the facial nerve: its relation to the spinal trigeminal and facial nucleus. *Brain Res*, 43 (2):662-667.
- Jakovcevski I, Siering J, Hargus G, Karl N, Hoelters L, Djogo N, Yin S, Zecevic N, Schachner M, Irintchev A. 2009. Close homologue of adhesion molecule L1 promotes survival of Purkinje and granule cells and granule cell migration during murine cerebellar development. *J Comp Neurol*, 513 (5):496-510.
- Jenny AB, Saper CB. 1987. Organization of the facial nucleus and corticofacial projection in the monkey: a reconsideration of the upper motor neuron facial palsy. *Neurology*, 37 (6):930-939.
- Jinno S, Yamada J. 2011. Using comparative anatomy in the axotomy model to identify distinct roles for microglia and astrocytes in synaptic stripping. *Neuron Glia Biol*, 7 (1):55-66.
- Jones LL, Banati RB, Graeber MB, Bonfanti L, Raivich G, Kreutzberg GW. 1997. Population control of microglia: does apoptosis play a role? *J Neurocytol*, 26 (11):755-770.
- Kaneko T, Fujiyama F, Hioki H. 2002. Immunohistochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat brain. *J Comp Neurol*, 444 (1):39-62.
- Katoh T, Ishige T, Kasai H, Naitoh J, Kaneko T, Kitamura T, Nagao K, Matsuzaki O. 1984. Malignant parotid gland tumors and facial nerve paralysis. *Arch Otorhinolaryngol*, 240 (2):139-144.
- Kaur C, Hao AJ, Wu CH, Ling EA. 2001. Origin of microglia. *Microsc Res Tech*, 54 (1):2-9.
- Kim SU, de Vellis J. 2005. Microglia in health and disease. *J Neurosci Res*, 81 (3):302-313.
- Koerber HR, Horsch KW. 1985. Axonotmesis as treatment for neurotmesis. *Exp Neurol*, 88 (2):316-326.
- Komiyama M, Shibata H, Suzuki T. 1984. Somatotopic representation of facial muscles within the facial nucleus of the mouse. A study using the retrograde horseradish peroxidase and cell degeneration techniques. *Brain Behav Evol*, 24 (2-3):144-151.
- Kreutzberg GW. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 19 (8):312-318.
- Li L, Lu J, Tay SS, Moomchala SM, He BP. 2007. The function of microglia, either neuroprotection or neurotoxicity, is determined by the equilibrium among factors released from activated microglia in vitro. *Brain Res*, 1159:8-17.

- Li YQ, Takada M, Kaneko T, Mizuno N. 1997. Distribution of GABAergic and glycinergic premotor neurons projecting to the facial and hypoglossal nuclei in the rat. *J Comp Neurol*, 378 (2):283-294.
- Lichtman JW, Colman H. 2000. Synapse elimination and indelible memory. *Neuron*, 25 (2):269-278.
- Lieberman AR. 1971. The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. *Int Rev Neurobiol*, 14:49-124.
- Lubinska L. 1977. Early course of Wallerian degeneration in myelinated fibres of the rat phrenic nerve. *Brain Res*, 130 (1):47-63.
- Lunn ER, Perry VH, Brown MC, Rosen H, Gordon S. 1989. Absence of Wallerian Degeneration does not Hinder Regeneration in Peripheral Nerve. *Eur J Neurosci*, 1 (1):27-33.
- Martin MR, Lodge D. 1977. Morphology of the facial nucleus of the rat. *Brain Res*, 123 (1):1-12.
- Marzo SJ, Leonetti JP, Petruzzelli G. 2002. Facial paralysis caused by malignant skull base neoplasms. *Ear Nose Throat J*, 81 (12):845-849.
- May M. 1970. Facial paralysis, peripheral type: a proposed method of reporting. (Emphasis on diagnosis and prognosis, as well as electrical and chorda tympani nerve testing). *Laryngoscope*, 80 (3):331-390.
- McIntire SL, Reimer RJ, Schuske K, Edwards RH, Jorgensen EM. 1997. Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature*, 389 (6653):870-876.
- Meier C, Sollmann H. 1977. Regeneration of cauda equina fibres after transection and end-to-end suture. Light and electron microscopic study in the pig. *J Neurol*, 215 (2):81-90.
- Miles GB, Hartley R, Todd AJ, Brownstone RM. 2007. Spinal cholinergic interneurons regulate the excitability of motoneurons during locomotion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (7):2448-2453.
- Moreno N, Morona R, Lopez JM, Gonzalez A. 2010. Subdivisions of the turtle *Pseudemys scripta* subplacium based on the expression of regulatory genes and neuronal markers. *J Comp Neurol*, 518 (24):4877-4902.
- Nakajima K, Kohsaka S. 2001. Microglia: activation and their significance in the central nervous system. *J Biochem*, 130 (2):169-175.
- Nakajima K, Honda S, Tohyama Y, Imai Y, Kohsaka S, Kurihara T. 2001. Neurotrophin secretion from cultured microglia. *J Neurosci Res*, 65 (4):322-331.
- Nara T, Goto N, Nozaki H, Maekawa K. 1989. [Development of the human facial nucleus: a morphometric study]. *No To Hattatsu*, 21 (5):453-459.
- Navarro X, Vivo M, Valero-Cabre A. 2007. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol*, 82 (4):163-201.
- Njoo FL, Wertheim-van Dillen P, Devriese PP. 1988. Serology in facial paralysis caused by clinically presumed herpes zoster infection. *Arch Otorhinolaryngol*, 245 (4):230-233.
- Odebode TO, Ologe FE. 2006. Facial nerve palsy after head injury: Case incidence, causes, clinical profile and outcome. *J Trauma*, 61 (2):388-391.
- Ogita S, Terada K, Niizuma T, Kosaka Y, Kataoka N. 2006. Characteristics of facial nerve palsy during childhood in Japan: frequency of varicella-zoster virus association. *Pediatr Int*, 48 (3):245-249.
- Olszewski J, Baxter DW. 1953. Cytoarchitecture of the Human Brain Stem. *Anatomical Record*, 115 (2):435-435.
- Osinga R, Buncke HJ, Buncke GM, Meuli-Simmen C. 2011. Subdivision of the sural nerve: step towards individual facial reanimation. *J Plast Surg Hand Surg*, 45 (1):3-7.
- Perry VH, Brown MC. 1992. Macrophages and nerve regeneration. *Curr Opin Neurobiol*, 2 (5):679-682.
- Piehl F, Tabar G, Cullheim S. 1995. Expression of NMDA receptor mRNAs in rat motoneurons is down-regulated after axotomy. *Eur J Neurosci*, 7 (10):2101-2110.
- Plunet W, Kwon BK, Tetzlaff W. 2002. Promoting axonal regeneration in the central nervous system by enhancing the cell body response to axotomy. *J Neurosci Res*, 68 (1):1-6.

- Probert L, Akassoglou K, Pasparakis M, Kontogeorgos G, Kollias G. 1995. Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (24):11294-11298.
- Raslan A. 2009. Stereological Analyses of Chemically Defined Synaptic Terminals in the Facial Nucleus after Facial-Facial Anastomosis in the Rat. *Diplomarbeit*, S. 20-34.
- Raslan A, Ernst P, Werle M, Thieme H, Szameit K, Finkensieper M, Guntinas-Lichius O, Irintchev A. 2013. Reduced cholinergic and glutamatergic synaptic input to regenerated motoneurons after facial nerve repair in rats: potential implications for recovery of motor function. *Brain Struct Funct*.
- Redaelli de Zinis LO, Gamba P, Balzanelli C. 2003. Acute otitis media and facial nerve paralysis in adults. *Otol Neurotol*, 24 (1):113-117.
- Rich MM, Lichtman JW. 1989. In vivo visualization of pre- and postsynaptic changes during synapse elimination in reinnervated mouse muscle. *J Neurosci*, 9 (5):1781-1805.
- Richardson PM, McGuinness UM, Aguayo AJ. 1980. Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts. *Nature*, 284 (5753):264-265.
- Ross B, Nedzelski JM, McLean JA. 1991. Efficacy of feedback training in long-standing facial nerve paresis. *Laryngoscope*, 101 (7 Pt 1):744-750.
- Rotter A, Schultz CM, Frosthalm A. 1984. Regulation of glycine receptor binding in the mouse hypoglossal nucleus in response to axotomy. *Brain Res Bull*, 13 (4):487-492.
- Sanes JR, Lichtman JW. 2001. Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci*, 2 (11):791-805.
- Sasaki Y, Ohsawa K, Kanazawa H, Kohsaka S, Imai Y. 2001. Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia. *Biochem Biophys Res Commun*, 286 (2):292-297.
- Savin LH. 1939. A Note on Three Cases Showing "Crocodile Tears" after Facial Paralysis. *Br J Ophthalmol*, 23 (7):479-482.
- Sawada M, Suzumura A, Marunouchi T. 1992. TNF alpha induces IL-6 production by astrocytes but not by microglia. *Brain Res*, 583 (1-2):296-299.
- Seddon HJ. 1942. A Classification of Nerve Injuries. *Br Med J*, 2 (4260):237-239.
- Senba E, Simmons DM, Wada E, Wada K, Swanson LW. 1990. RNA levels of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits are differentially regulated in axotomized facial motoneurons: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res*, 8 (4):349-353.
- Sherwood CC. 2005. Comparative anatomy of the facial motor nucleus in mammals, with an analysis of neuron numbers in primates. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 287 (1):1067-1079.
- Son YJ, Trachtenberg JT, Thompson WJ. 1996. Schwann cells induce and guide sprouting and reinnervation of neuromuscular junctions. *Trends Neurosci*, 19 (7):280-285.
- Sonmez OF, Odaci E, Bas O, Colakoglu S, Sahin B, Bilgic S, Kaplan S. 2010. A stereological study of MRI and the Cavalieri principle combined for diagnosis and monitoring of brain tumor volume. *J Clin Neurosci*, 17 (12):1499-1502.
- Soreide AJ. 1981. Variations in the axon reaction after different types of nerve lesion. Light and electron microscopic studies on the facial nucleus of the rat. *Acta Anat (Basel)*, 110 (2):173-188.
- Spector JG, Lee P, Peterein J, Roufa D. 1991. Facial nerve regeneration through autologous nerve grafts: a clinical and experimental study. *Laryngoscope*, 101 (5):537-554.
- Spranger M, Lindholm D, Bandtlow C, Heumann R, Gnahn H, Naher-Noe M, Thoenen H. 1990. Regulation of Nerve Growth Factor (NGF) Synthesis in the Rat Central Nervous System: Comparison between the Effects of Interleukin-1 and Various Growth Factors in Astrocyte Cultures and in vivo. *Eur J Neurosci*, 2 (1):69-76.
- Starritt NE, Kettle SAJ, Glasby MA. 2011. Sutureless Repair of the Facial Nerve Using Biodegradable Glass Fabric. *Laryngoscope*, 121 (8):1614-1619.
- Streit WJ, Semple-Rowland SL, Hurley SD, Miller RC, Popovich PG, Stokes BT. 1998. Cytokine mRNA profiles in contused spinal cord and axotomized facial nucleus suggest a beneficial role for inflammation and gliosis. *Exp Neurol*, 152 (1):74-87.

- Tereshchenko Y, Morellini F, Dityatev A, Schachner M, Irintchev A. 2011. Neural cell adhesion molecule ablation in mice causes hippocampal dysplasia and loss of septal cholinergic neurons. *J Comp Neurol*, 519 (12):2475-2492.
- Thomas PK. 1966. The cellular response to nerve injury. 1. The cellular outgrowth from the distal stump of transected nerve. *J Anat*, 100 (Pt 2):287-303.
- Thurner KH, Egg G, Spoendlin H, Schrott-Fischer A. 1993. A quantitative study of nerve fibers in the human facial nerve. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 250 (3):161-167.
- Tomov TL, Guntinas-Lichius O, Grosheva M, Streppel M, Schraermeyer U, Neiss WF, Angelov DN. 2002. An example of neural plasticity evoked by putative behavioral demand and early use of vibrissal hairs after facial nerve transection. *Exp Neurol*, 178 (2):207-218.
- Trepel M. 2012. *Neuroanatomie, Struktur und Funktion*. 5. Auflage Elsevier GmbH München, S. 67-124.
- Tulley P, Webb A, Chana JS, Tan ST, Hudson D, Grobbelaar AO, Harrison DH. 2000. Paralysis of the marginal mandibular branch of the facial nerve: treatment options. *Br J Plast Surg*, 53 (5):378-385.
- Turk-Boru U, Kocer A, Bilge C. 2005. The efficacy of steroids in idiopathic facial nerve paralysis: an open, randomized, prospective controlled study. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg*, 14 (3-4):62-66.
- Ulrich-Lai YM, Jones KR, Ziegler DR, Cullinan WE, Herman JP. 2011. Forebrain origins of glutamatergic innervation to the rat paraventricular nucleus of the hypothalamus: differential inputs to the anterior versus posterior subregions. *J Comp Neurol*, 519 (7):1301-1319.
- Urban PP, Wicht S, Vucorevic G, Fitzek S, Marx J, Thomke F, Mika-Gruttner A, Fitzek C, Stoeter P, Hopf HC. 2001. The course of corticofacial projections in the human brainstem. *Brain*, 124 (Pt 9):1866-1876.
- Vanderhaeghen P, Cheng HJ. 2010. Guidance molecules in axon pruning and cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2 (6):a001859.
- Vassias I, Lecolle S, Vidal PP, de Waele C. 2005. Modulation of GABA receptor subunits in rat facial motoneurons after axotomy. *Brain Res Mol Brain Res*, 135 (1-2):260-275.
- Vaughan ED, Richardson D. 1993. Facial nerve reconstruction following ablative parotid surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 31 (5):274-280.
- Volk GF, Pantel M, Streppel M, Guntinas-Lichius O. 2011. Reconstruction of complex peripheral facial nerve defects by a combined approach using facial nerve interpositional graft and hypoglossal-facial jump nerve suture. *Laryngoscope*, 121 (11):2402-2405.
- Waespe N, Steffen I, Heininger U. 2010. Etiology of aseptic meningitis, peripheral facial nerve palsy, and a combination of both in children. *Pediatr Infect Dis J*, 29 (5):453-456.
- Walker HK. 1990. Cranial Nerve VII: The Facial Nerve and Taste. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, Hrsg. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd Aufl. Boston.
- Waller A. 1852. New Method for the Study of the Nervous System. *Lond J Med*, 4 (43):609-625.
- Wang Y, Kakizaki T, Sakagami H, Saito K, Ebihara S, Kato M, Hirabayashi M, Saito Y, Furuya N, Yanagawa Y. 2009. Fluorescent labeling of both GABAergic and glycinergic neurons in vesicular GABA transporter (VGAT)-venus transgenic mouse. *Neuroscience*, 164 (3):1031-1043.
- Wankowicz Z, Megyeri P, Issekutz A. 1988. Synergy between tumour necrosis factor alpha and interleukin-1 in the induction of polymorphonuclear leukocyte migration during inflammation. *J Leukoc Biol*, 43 (4):349-356.
- Watson CR, Sakai S, Armstrong W. 1982. Organization of the facial nucleus in the rat. *Brain Behav Evol*, 20 (1-2):19-28.
- West MJ. 1993. New Stereological Methods for Counting Neurons. *Neurobiology of Aging*, 14 (4):275-285.
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 231 (4):482-497.

- Wexler DB, Fetter TW, Gantz BJ. 1990. Vestibular schwannoma presenting with sudden facial paralysis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 116 (4):483-485.
- Yamada M, Ohsawa K, Imai Y, Kohsaka S, Kamitori S. 2006. X-ray structures of the microglia/macrophage-specific protein Iba1 from human and mouse demonstrate novel molecular conformation change induced by calcium binding. *J Mol Biol*, 364 (3):449-457.
- Zujovic V, Luo D, Baker HV, Lopez MC, Miller KR, Streit WJ, Harrison JK. 2005. The facial motor nucleus transcriptional program in response to peripheral nerve injury identifies Hn1 as a regeneration-associated gene. *J Neurosci Res*, 82 (5):581-591.

8. Anhang

8.1 Tabellen

Tab.1 Primäre und sekundäre Antikörper und Agenzien für die Immunhistochemie

Antigen	Spezies und Typ	Anbieter	Code	Verdünnung	Referenzen
ChAT (Cholin-Acetyltransferase)	Ziege polyklonal	Chemicon/ Millipore, Schwalbach, Deutschland	AB144P	1:500	(Moreno et al. 2010, Tereshchenko et al. 2011)
Iba1 (ionisiertes-Calcium-bindendes-Adaptormolekül-1)	Kaninchen polyklonal	Wako Chemicals, Neuss, Deutschland	019-19741	1:1500	(Irintchev et al. 2005, Bulloch et al. 2008, Jakovcevski et al. 2009, Bosco et al. 2011)
VGAT (vesikulärer GABA-Transporter)	Maus monoklonal	Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland	131 011/117G4	1:500	(Apostolova et al. 2006, Jakovcevski et al. 2009)
VGLUT2 (vesikulärer Glutamat-Transporter-2)	Kaninchen polyklonal	Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland	135 403	1:1000	(Jakovcevski et al. 2009, Issa et al. 2010, Ulrich-Lai et al. 2011)
nAChR (nikotinerger Acetylcholin-Rezeptor)	α -Bungarotoxin, Alexa Fluor 488-konjugiert	Molecular Probes, Eugen, Oregon, USA	B-13422	1:2000	
Ziegen IgG	Esel, Cy3-konjugiert polyklonal	Jackson Immuno-Research Europe, Suffolk, UK	705-165-003	1:200	
Maus IgG	Ziege, Cy3-konjugiert polyklonal	Jackson Immuno-Research	115-165-003	1:200	
Kaninchen IgG	Ziege, Cy3-konjugiert polyklonal	Jackson Immuno-Research	111-165-003	1:200	

Tab.2 Parameter der Disektoren bei der stereologischen Analyse

Analyse	x-Achse (μm)	y-Achse (μm)	z-Achse (μm)	Abstand (μm)
Motoneurone	100	100	10	0
Iba1	60	60	10	200
VGLUT2	10	10	5	250
VGAT	10	10	5	250

8.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Philipp Ernst
Email: ernstein@aol.com
Geburtstag und -ort: 31.12.1983 in Dresden

Schul Ausbildung

09/1990 – 07/1994 57. Grundschule Dresden
09/1994 – 07/2000 Evangelisches Kreuzgymnasium Dresden
09/2000 – 07/2003 Gymnasium Carl-Maria-von-Weber Dresden, Abitur

Zivildienst

08/2003 – 05/2004 Pfleger an der „Professor Dr. Rainer Fetscher“-Schule Dresden,
Schule für Mehrfach- und Körperbehinderte

Berufsorientiertes soziales Jahr

08/2004 – 07/2005 Pfleger an der Werkstatt für behinderte Menschen, Lebenshilfe
Ostverband Dresden e.V.

Ausbildung

09/2005 – 08/2008 Ausbildung zum Medizinisch-Technischen Assistenten für
Funktionsdiagnostik (MTA-F), BWM-Bildungsstätte Leipzig

Berufstätigkeit

08/2008 – 10/2008 MTA für Funktionsdiagnostik an der Klinik für HNO, Uniklinikum
Carl-Gustav-Carus Dresden

Studium

seit 10/2008 Studium der Humanmedizin an der Universität Jena
Abschluss des ersten Abschnitts der ärztlichen Prüfung 09/2010

Ort, Datum

Unterschrift

8.3 Danksagung

Der größte Dank gilt meinen Eltern, die mir bei meinem Vorhaben stets Vertrauen schenkten und mir mit jeglicher Unterstützung stets den Rücken gestärkt haben.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei Herrn PD Dr. Andrey Irintchev für die hervorragende Betreuung und Beratung während der gesamten Zeit der experimentellen Arbeit bis zur Entstehung dieser Dissertation und darüber hinaus bedanken.

Ein besonderer Dank gilt auch der MTA und Kollegin Frau Heike Thieme, die mir mit vielseitiger Unterstützung und fundiertem Feedback zu theoretischen und praktischen Elementen stets zur Seite stand.

Schließlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Orlando Guntinas-Lichius für die allzeitig souveräne Betreuung dieser Arbeit und dafür, dass es mir ermöglicht wurde an diesem spannenden Projekt in der Arbeitsgruppe mitarbeiten zu dürfen.

8.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind ,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Orlando Guntinas-Lichius, PD Dr. Andrey Irintchev, Heike Thieme

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

8.5 Publikation

Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurden März 2013 in einer geteilten Erstautorenschaft zusammen mit Abdulrahman Raslan publiziert:

Raslan A, Ernst P, Werle M, Thieme H, Szameit K, Finkensieper M, Guntinas-Lichius O, Irintchev A. 2013. Reduced cholinergic and glutamatergic synaptic input to regenerated motoneurons after facial nerve repair in rats: potential implications for recovery of motor function. Brain Struct Funct. (im Druck) DOI: 10.1007/s00429-013-0542-6